

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

**Nové typy magnetických sorbentů pro analýzu
fosfoproteinů**

**New types of magnetic sorbents for
phosphoprotein analysis**

Diplomová práce

Tereza Emmerová

Vedoucí diplomové práce: Ing. Zdenka Kučerová, CSc.

Garant diplomové práce: Prof. RNDr. Marie Tichá, CSc.

Praha 2010

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky Ing. Zdenky Kučerové, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 28. 04. 2010

Tereza Emmerová

Ráda bych poděkovala Ing. Zdence Kučerové, CSc. za odborné vedení a možnost vypracování diplomové práce na Ústavu patologické fyziologie a CEH, 1. lékařské fakulty UK v Praze.

Také bych ráda poděkovala Prof. RNDr. Marii Tiché, CSc. za odborné konzultace, připomínky a pomoc při vypracování diplomové práce.

Děkuji Mgr. Lence Novotné, PhD. za trpělivé vedení, množství praktických rad a veškeré materiály, které mi pro tuto práci poskytla. Také děkuji RNDr. Petru Přikrylovi, PhD. a Bc. Janě Vávrové za měření na hmotnostním spektrometru.

Dále děkuji Doc. RNDr. Petrovi Hodkovi, CSc. za zájem o tuto práci a množství cenných informací a praktických rad, které mi poskytl.

V neposlední řadě děkuji své rodinně za všestrannou podporu v průběhu celého studia.

Tato diplomová práce vznikla za finanční podpory projektů MŠMT: No. 0021620806 a No. LC 06044 a projektu GAČR 203/09/0857.

ABSTRACT

The method for the study of protein phosphorylation sites was elaborated. This method is based on the isolation of phosphopeptides from protein proteolytic digests using immobilized metal affinity chromatography (IMAC) and on their subsequent identification by mass spectrometry (MS). Magnetic non-porous hydrophilic poly(2-hydroxyethyl methacrylate-*co*-glycidyl methacrylate) particles prepared by the dispersion polymerization and modified with iminodiacetic acid (IDA) were newly employed for the IMAC separation of phosphopeptides. Fe(III) and Ga(III) ions immobilized on IDA-modified magnetic microspheres were used for the enrichment of phosphopeptides from the proteolytic digests of two model proteins, porcine pepsin A and bovine α -casein, differing in their physico-chemical properties and phosphate group content. The optimum conditions for phosphopeptide adsorption and desorption in both cases were investigated and compared. The phosphopeptides separated from both proteolytic digests were analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight MS.

For the immunochemical separation of phosphoproteins, protein fraction containing antibodies was obtained from egg yolk of hens immunized with O-phosphoryl-L-serine conjugated to key limpet hemocyanin. Antibodies were purified using affinity chromatography on immobilized α -casein and their presence was proven by MS. Specificity of the obtained antibodies was examined using ELISA tests. Obtained results showed, that specificity of the isolated antibodies was not high. (In Czech)

OBSAH

| | |
|--|----|
| SEZNAM ZKRATEK | 7 |
| 1. TEORETICKÁ ČÁST | 8 |
| 1.1 Fosforylace proteinů a její význam | 8 |
| 1.2 Fosforylace u prokaryotických a eukaryotických organismů | 8 |
| 1.3 Regulace fosforylace | 9 |
| 1.4 Fosfoproteomika | 10 |
| 1.5 Metody selektivní separace fosfopeptidů a fosfoproteinů | 11 |
| 1.5.1 Metody s použitím fosfospecifických protilátek | 11 |
| 1.5.2 Metody využívající chemické modifikace fosfátové skupiny | 13 |
| 1.5.3 Chromatografické metody používané při separaci fosfoproteinů a fosfopeptidů | 14 |
| 1.5.3.1 Iontově výměnná chromatografie | 14 |
| 1.5.3.2 Afinitní chromatografie využívající interakci s oxidy kovů | 15 |
| 1.5.3.3 Afinitní chromatografie na sorbentech s imobilizovanými kovovými ionty | 17 |
| 1.6 Analýza fosfopeptidů a fosfoproteinů hmotnostní spektrometrií | 19 |
| 2. CÍL PRÁCE | 22 |
| 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 24 |
| 3.1 Použitý materiál a chemikálie | 24 |
| 3.1.1 Chemikálie | 24 |
| 3.1.2 Magnetické částice P(HEMA- <i>co</i> -GMA) obsahující vázanou IDA | 24 |
| 3.1.3 Slepíčí protilátky IgY | 25 |
| 3.2 Přístroje | 25 |
| 3.3 Metody studia fosfoproteinů pomocí IMAC separace na magnetických sorbentech a MS analýzy | 26 |
| 3.3.1 Proteolytické štěpení modelových fosfoproteinů | 26 |
| 3.3.1.1 Štěpení α -kaseinu trypsinem | 26 |

| | |
|---|----|
| 3.3.1.2 Štěpení prasečího pepsinu A α -chymotrypsinem | 26 |
| 3.3.2 Přečistění a odsolení frakce peptidů na špičkách s C18 fází | 27 |
| 3.3.3 Separace fosforylovaných peptidů pomocí IMAC na magnetických sorbentech s imobilizovanými Fe(III) a Ga(III) ionty | 28 |
| 3.3.3.1 Sycení magnetických sorbentů Fe(III) a Ga(III) ionty | 28 |
| 3.3.3.2 Obecný postup při IMAC separaci | 28 |
| 3.3.3.3 Optimalizace adsorpčních a elučních podmínek | 29 |
| 3.3.4 MALDI-TOF MS a MALDI-TOF MS/ MS analýza..... | 29 |
| 3.3.4.1 Aplikace vzorků na MALDI terčík | 29 |
| 3.3.4.2 Identifikace peptidů | 30 |
| 3.4 Metody studia fosfoproteinů pomocí slepičích protilátek specifických pro fosfoserin | 30 |
| 3.4.1 Afinitní izolace slepičích protilátek IgY na sloupci α -kasein-Sepharosy | 30 |
| 3.4.1.1 Imobilizace α -kaseinu na CNBr-aktivovanou Sepharosu..... | 30 |
| 3.4.1.2 Afinitní purifikace protilátek IgY na Sepharose s imobilizovaným α -kaseinem..... | 31 |
| 3.4.2 ELISA test - zhodnocení specifity separovaných protilátek IgY | 32 |
| 3.4.2.1 Příprava syntetického antigenu pro ELISA testy..... | 32 |
| 3.4.2.2 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)..... | 32 |
| 3.4.3 SDS-PAGE elektroforéza..... | 34 |
| 3.4.3.1 Identifikace proteinů separovaných SDS-PAGE elektroforézou..... | 35 |
| 4. VÝSLEDKY | 37 |
| 4.1 Použití P(HEMA-co-GMA) magnetických částic jako sorbentu pro IMAC separaci fosfopeptidů..... | 37 |
| 4.2 Separace fosfopeptidů z proteolytických směsí peptidů α -kaseinu a prasečího pepsinu A pomocí připravených magnetických sorbentů | 38 |
| 4.2.1 Optimalizace podmínek pro adsorpci a eluci fosfopeptidů | 38 |
| 4.3 MALDI-TOF MS analýza frakce fosfopeptidů separované z proteolyticky štěpených modelových fosfoproteinů | 41 |

| | | |
|---------|---|----|
| 4.3.1 | Separace fosfopeptidů z proteolytické směsi peptidů α -kaseinu..... | 44 |
| 4.3.2 | Separace fosfopeptidů z proteolytické směsi peptidů prasečího pepsinu A..... | 47 |
| 4.3.3 | MALDI-TOF MS/MS analýza fosfopeptidů separovaných z proteolytických směsí peptidů α -kaseinu a prasečího pepsinu A | 48 |
| 4.4 | Purifikace slepičích protilátek proti proteinům fosforylovaných na serinových zbytcích pomocí afinitní chromatografie na Sepharose s imobilizovaným α -kaseinem..... | 50 |
| 4.4.1 | Imobilizace α -kaseinu na CNBr-aktivovanou Sepharosu..... | 50 |
| 4.4.2 | Afinitní purifikace protilátek IgY na Sepharose s imobilizovaným α -kaseinem..... | 50 |
| 4.5 | Charakterizace protilátek IgY purifikovaných afinitní chromatografií na imobilizovaném α -kaseinu | 51 |
| 4.5.1 | UV spektra v oblasti 200-400 nm..... | 52 |
| 4.5.2 | ELISA test – zhodnocení specifity připravených protilátek IgY | 53 |
| 4.5.2.1 | Příprava syntetického antigenu pro ELISU protilátek..... | 53 |
| 4.5.2.2 | ELISA test..... | 54 |
| 4.5.3 | SDS-PAGE elektroforéza..... | 55 |
| 5. | DISKUZE | 59 |
| 6. | ZÁVĚR | 69 |
| | SEZNAM LITERATURY | 70 |

SEZNAM ZKRATEK

| | |
|------------------------------|---|
| ACN | acetonitril |
| BSA | hovězí sérový albumin |
| DTT | dithiothreitol |
| IAA | iodoacetamid |
| IDA | iminodiotová kyselina |
| IMAC | afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech |
| KLH | Keyhole limpet hemocyanin |
| MA-BSA | maleylovaný hovězí sérový albumin |
| MALDI TOF | matrix assisted laser desorption ionization – time-of-flight |
| MS | hmotnostní analýza |
| NTA | nitrilotrioctová kyselina |
| P(HEMA-<i>co</i>-GMA) | poly(2-hydroxyethyl metakrylát- <i>co</i> -glycidyl metakrylát) |
| p-Ser-MA-BSA | maleylovaný hovězí sérový albumin s navázaným O-fosforyl-L-serinem |
| TFA | kyselina trifluoroctová |

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Fosforylace proteinů a její význam

V současné době je fosforylace proteinů jednou z nejintenzivněji studovaných posttranslačních modifikací. Je známo nejméně 200 různých typů posttranslačních modifikací, z toho pouze malá část je reverzibilních a nezbytných při regulacích biologických procesů [1].

První fosfoproteiny byly objeveny již na počátku 19. století, když bylo zjištěno, že fosvitin z vaječného žloutku a kaseiny z mléka mohou obsahovat 1-10% fosforu vázaného převážně na serinové zbytky [2]. Zda hraje fosforylace proteinů nějakou regulační roli nebylo dlouhou dobu jasné. První důkaz úlohy fosforylace v regulačních procesech byl popsán v roce 1955. Fisher a Krebs [3] a Sutherland a Wosilait [4] poprvé popsali nezbytnost reverzibilní fosforylace při přeměně fosforylázy glykogenu z inaktivní na aktivní formu. Inaktivní b-forma tohoto enzymu je převedena na aktivní a-formu reverzní fosforylací, přeměnu katalyzuje kináza fosforylázy. Od té doby zájem o studium fosforylace a její role při regulacích funkce proteinů neustále vzrůstá [1, 2].

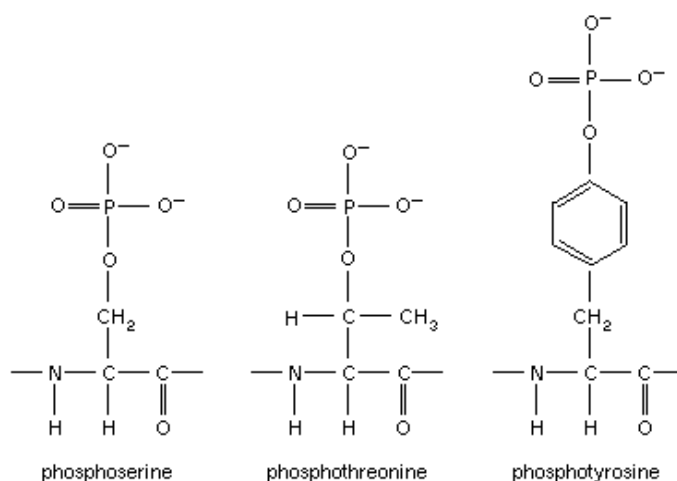
Dnes je známo, že všechny procesy regulované fosforylací proteinů jsou reverzibilní a jsou regulovány dvěma třídami enzymů: proteinkinázami a proteinfosfatázami [1, 2, 5]. Reverzibilní fosforylace je hlavním regulátorem buněčných procesů jako je růst, dělení a diferenciaci buňky, kontrola buněčného cyklu, přenos signálu, genová exprese a metabolismus. Vedle toho fosforylace hraje klíčovou roli v signální transdukcii, v intracelulární komunikaci v průběhu růstu, v aktivaci imunitního systému a v činnosti nervového systému [1, 5, 6].

1.2 Fosforylace u prokaryotických a eukaryotických organismů

Jsou známy čtyři typy vazby fosfátů na aminokyseliny v peptidovém řetězci: O-fosfáty, N-fosfáty, acylfosfáty a S-fosfáty. Z nich O-fosfáty jsou zdaleka nejhojnější a fosfátová skupina je navázána na serinové, threoninové nebo tyrosinové zbytky (Obr. 1.1). N-fosforylace na histidinových a lysinových zbytcích, S-fosforylace na cysteinových zbytcích a acyl-fosforylace na zbytcích kyseliny glutamové a kyseliny asparagové se

vyskytuje u různých organismů, je však mnohem méně častá. Při studiu fosforylace je těmto druhům fosforylace věnována mnohem menší pozornost, protože tyto modifikace jsou obvykle velmi nestabilní a pro jejich výzkum jsou třeba velmi speciální techniky [1, 7].

U eukaryotických a prokaryotických organismů se liší zastoupení jednotlivých typů fosforylace aminokyselin. Odhaduje se, že asi jedna třetina proteinů v eukaryotické buňce je fosforylována. U eukaryotických organismů je nejčastějším typem O-fosforylace na serinových, threoninových nebo tyrosinových zbytcích (Obr. 1.1). Fosforylace na serinových a threoninových zbytcích je mnohem častější než fosforylace na tyrosinových zbytcích v poměru fosfoserin: fosfothreonin: fosfotyrosin po řadě 1800 : 200 : 1. U prokaryotických organismů se často vyskytují N-fosfáty především fosfohistidiny a acylfosfáty. O-fosforylace se u prokaryotických organismů také vyskytuje, ale je méně častá [1, 5, 7].



Obr. 1.1: O-Fosforylovaný L-serin, L-threonin a L-tyrosin v peptidovém řetězci.

1.3 Regulace fosforylace

Procesy regulované fosforylací proteinů jsou reverzibilní a jsou regulovány dvěma třídami enzymů: proteinkinázami a proteinfosfatázami. Enzymy z rodiny proteinkináz katalyzují navázání fosfátové skupiny na molekulu proteinu: katalyzují přenos fosfátové skupiny z makroergické sloučeniny na nukleofilní akceptor – postranní řetězec aminokyselinového zbytku v proteinu. Opačnou reakci, defosforylaci, tj. hydrolýzu fosfodiesterové vazby, katalyzují proteinfosfatázy. Velký význam a klíčová role fosforylace a defosforylace proteinů je také dána skutečností, že lidský genom kóduje

velký počet proteinkináz a proteinfosfatáz, což představuje asi 2 % všech genů [1]. Buňka obsahuje stovky proteinkináz a proteinfosfatáz, z nichž každá odpovídá za fosforylaci/defosforylaci určitého proteinu nebo skupiny proteinů. Stav momentální fosforylace proteinu, a tím i jeho aktivita, závisí na poměru aktivit proteinkináz a proteinfosfatáz, které na něj působí [5]. Poškození nebo změny proteinkináz a proteinfosfatáz mohou mít za následek těžké poškození buněk, což může vést k patologickým stavům jako je rakovina nebo neurodegenerace [1].

Eukaryotické proteinkinázy lze rozdělit do dvou skupin, podle toho jaké aminokyseliny fosforylují: Ser/Thr-proteinkinázy a Tyr-proteinkinázy. Některé proteinkinázy mohou mít tzv. duální specifitu, takže působí zároveň jako Ser/Thr-proteinkinázy a Tyr-proteinkinázy. Proteinfosfatázy se rozdělují podle stejného principu na: Ser/Thr-proteinfosfatázy a Tyr-proteinfosfatázy a proteinfosfatázy s duální funkcí [2].

1.4 Fosfoproteomika

Fosfoproteomika je podobor proteomiky zabývající se globální analýzou fosforylace proteinů. K hlavním cílům fosfoproteomiky patří: identifikace fosfoproteinů a fosfopeptidů, přesné určení místa fosforylace a kvantifikace fosforylace. I přesto, že separační techniky a metody hmotnostní spektrometrie prošly v posledních letech rozsáhlým vývojem, není analýza fosfoproteomu jednoduchou a rutinní záležitostí. Obtíže při studiu fosforylace jsou způsobeny především následujícími důvody:

- Rozsah fosforylace je obecně nízký, jen nepatrná část proteinů v buňce je v daném časovém okamžiku fosforylována.
- Absolutní množství fosfoproteinu v buňce je velmi malé.
- Fosforylační místa stejného proteinu se mohou lišit, protože fosfoproteiny jsou heterogenní a vyskytují se v různých fosforylovaných formách.
- Přítomnost fosfatáz může mít za následek defosforylaci aminokyselinových zbytků.
- Většina analytických metod používaných při studiu fosfoproteinů má omezený dynamický rozsah.
- Fosfopeptidy jsou hydrofilní a účinnost jejich ionizace při hmotnostní analýze je podstatně nižší v porovnání s nemodifikovanými peptidy.

V posledních letech byla vyvinuta řada metodických přístupů, které se snaží alespoň částečně odstranit nebo zmírnit výše uvedené komplikace spojené s analýzou fosfopeptidů

a fosfoproteinů. Vývoj a optimalizace metod pro selektivní separaci fosfopeptidů a fosfoproteinů představuje nezbytný základ studia fosforylace v buňce v daném časovém okamžiku i identifikaci fosforylačních míst [1, 5]. K určení fosforylačních míst a identifikaci fosfoproteinů jsou dnes téměř výhradně používány metody založené na hmotnostní spektrometrii [8].

1.5 Metody selektivní separace fosfopeptidů a fosfoproteinů

Jak již bylo uvedeno, pouze malá část proteinů v buňce nebo studovaném systému je v daném časovém okamžiku fosforylována. Pro úspěšnou charakterizaci fosforylace je proto nezbytné fosfoproteiny a fosfopeptidy nejprve izolovat a snížit tak komplexitu vzorku a zároveň zvýšit citlivost detekce fosfoproteinů a fosfopeptidů [5]. Doposud byly vyvinuty různé metody pro izolaci fosfopeptidů a fosfoproteinů z komplexních směsí. Tyto metody lze rozdělit do tří hlavních kategorií:

(1) Imunoprecipitace s použitím specifických protilátek proti fosfoserinu, fosfothreoninu nebo fosfotyrosinu. Metoda je limitována především selektivitou použitých protilátek a nevýhodou je také poměrně vysoká finanční náročnost metody.

(2) Metody založené na chemické modifikaci fosfátových skupin, jejichž hlavní nevýhodou je časová náročnost a ztráty vzorků způsobené velkým množstvím reakčních kroků.

(3) Chromatografické metody založené na specifické interakci fosfátové skupiny s adsorbentem jako jsou oxidy kovů (ZrO_2 , TiO_2 , Al_2O_3), imobilizované ionty kovů (Fe^{3+} , Ga^{3+} , Ni^{2+} , Zr^{4+}) nebo s adsorbentem pro iontově-výměnnou chromatografii [9].

V následující části práce jsou stručně shrnuty nejdůležitější metody používané při separacích fosfopeptidů a fosfoproteinů a uveden jejich základní princip.

1.5.1 Metody s použitím fosfospecifických protilátek

Imunoprecipitace pomocí fosfospecifických protilátek je považována za jednu z nejjednodušších metod používaných pro selektivní izolaci fosfoproteinů [5]. V roce 1981 Ross a kol. [10] poprvé použily specifické protilátky proti fosfotyrosinu k izolaci proteinů fosforylovaných na tyrosinových zbytcích. Od té doby bylo připraveno několik typů polyklonálních a monoklonálních protilátek specifických pro fosfoserin, fosfothreonin a fosfotyrosin [6].

Důležitou vlastností je selektivita a afinita protilátek, jinak může být detekováno velké množství „falešně pozitivních odpovědí“, které výrazně snižují použitelnost této metody [1]. V mnoha pracích již byly úspěšně použity protilátky specifické pro fosfotyrosin k separaci proteinů fosforylovaných na tyrosinových zbytcích [10, 15, 16, 17]. Zatímco protilátky specifické pro fosfotyrosin jsou běžně dostupné a používány při imunoprecipitacích fosfoproteinů, spolehlivé protilátky specifické pro fosfoserin a fosfothreonin stále nejsou běžně dostupné [1]. Protilátky specifické pro fosfoserin a fosfothreonin totiž velmi často rozpoznávají celý sekvenční motiv obklopující fosforylovaný aminokyselinový zbytek, proto jsou schopné imunoprecipitovat pouze některé fosfoproteiny [6].

Ačkoli se použití fosfospecifických protilátek zdá být vhodný nástroj pro separace fosforylovaných proteinů, stále se nedaří získat větší množství proteinů při použití této metody. Obvykle se daří separovat fosfoproteiny z buněčného extraktu v malých množstvích pro analytické účely. Výtěžek separace proteinů s použitím fosfospecifických protilátek může být zvýšen částečnou nebo úplnou denaturací proteinů. Lepších výsledků bylo také dosaženo při použití několika různých typů protilátek [6].

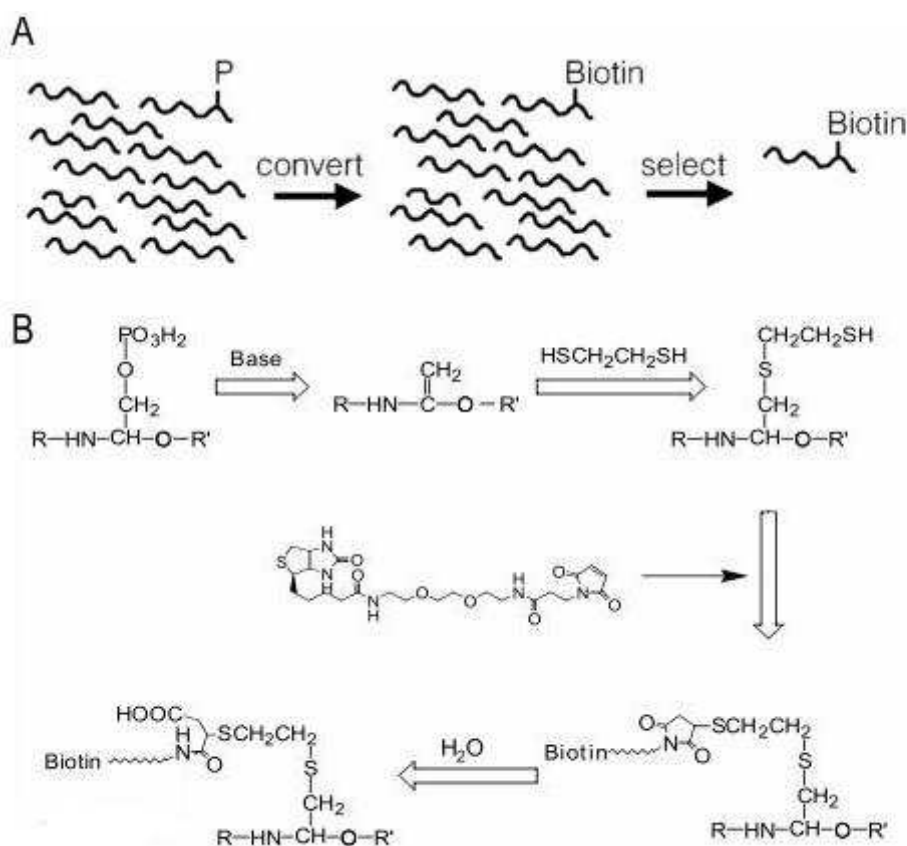
Grønborg a kol. [11] použili komerčně dostupné protilátky specifické pro fosfoserin a fosfothreonin k identifikaci fosforylačních míst fosfoproteinů z buněk při použití inhibitoru fosfatáz. Kromě identifikace známých fosforylačních míst některých proteinů (drebrin 1, α -actinin, filamin 1) bylo identifikováno i několik dosud neznámých fosforylačních míst proteinu Frigg. I přesto jsou pokusy izolovat proteiny fosforylované na serinových a threoninových zbytcích pomocí fosfospecifických protilátek spíše ojedinělé [5].

Jak již bylo uvedeno protilátky specifické pro fosfotyrosin jsou běžně používány k separaci proteinů fosforylovaných na tyrosinových zbytcích. Snahy o izolaci fosfopeptidů obsahujících tyrosinové zbytky pomocí fosfospecifických protilátek nebyly úspěšné, především díky nízké selektivitě použitých protilátek [12, 13]. V roce 2006 Zhang a Neubertem [14] úspěšně použili protilátky proti fosfotyrosinu k imunoprecipitaci fosfopeptidů obsahujících fosfotyrosin, vyšší selektivity protilátek se jim podařilo dosáhnout přidáním detergentu do imunoprecipitačního pufru. Protilátky specifické pro fosfotyrosin byly v nedávné době imobilizovány na magnetické částice přes protein G a úspěšně použity k separaci fosfopeptidů z proteolytické směsi nefosforylovaných peptidů [61].

1.5.2 Metody využívající chemické modifikace fosfátové skupiny

Další metody separace fosfoproteinů a fosfopeptidů z komplexních směsí jsou založeny na chemické modifikaci fosfátové skupiny.

Jeden z možných přístupů spočívá ve vystavení směsi proteinů či peptidů alkalickému pH, čímž dojde k β -eliminaci fosfátové skupiny. Vzniklá reaktivní dvojná vazba reaguje s nukleofilním činidlem - ethan-1,2-dithiolem. Na volnou thiolovou skupinu ethan-1,2-dithiolu se naváže biotin a takto označené peptidy/ proteiny jsou jednoduše separovány na avidinové koloně (Obr. 1.2). Přístup je použitelný pouze pro peptidy a proteiny fosforylované na serinových nebo threoninových zbytcích, protože fosfotyrosinové zbytky nepodléhají β -eliminaci. Případné komplikace může způsobit O-glykosylace, která snadno podléhá β -eliminaci. Nevýhodou je také nutnost modifikace cysteinových zbytků oxidací kyselinou permravněčí, což ovšem vede i k nežádoucí oxidaci methioninu a tryptofanu [18].



Obr. 1.2: A – Separace fosfopeptidů/ fosfoproteinů z komplexní směsi peptidů/ proteinů.

B – Schéma chemické konverze fosfoserinu na derivát biotinu. Upraveno podle [18].

V druhém přístupu jsou nejprve alkylovány cysteiny a poté jsou proteiny štěpeny specifickou proteázou. Chemické reakce pro selektivní izolaci fosfopeptidů z peptidové směsi jsou složené z následujících šesti kroků: 1.) Ochránění aminoskupin: aminoskupiny peptidů jsou zablokovány *tert*-butoxykarbonylovou skupinou. 2.) Kondenzační reakce: karboxylové a fosfátové skupiny peptidů jsou derivatizovány amidací. 3.) Regenerace fosfátové skupiny: fosfátové skupiny jsou regenerovány kyselou hydrolýzou fosforamidových vazeb. Přebytný amin je odstraněn promytím na reverzní fázi. 4.) Kondenzace a redukce: fosfopeptidy jsou modifikovány kondenzací s cystaminem. Následuje redukce disulfidických můstků cystaminu za vzniku sulfhydrylové skupiny na každou fosfátovou skupinu. 5.) Zachycení na pevné fázi: přebytek cystaminu, redukčního činidla a vedlejších produktů je odstraněn promytím na pevné fázi. Označené fosfopeptidy jsou kovalentně zachyceny na nosiči s imobilizovanou jodoctovou kyselinou. 6.) Uvolnění fosfopeptidů: zachycené fosfopeptidy jsou uvolněny trifluoroctovou kyselinou a analyzovány. Oproti předchozí metodě, je tato metoda použitelná pro peptidy a proteiny fosforylované na serinových, threoninových i tyrosinových zbytcích [19].

Oba uvedené postupy se skládají z celé řady chemických reakcí a promývacích kroků, každý s těchto kroků představuje nezanedbatelné ztráty vzorku. Dostatečné množství vzorku je tedy obecným požadavkem těchto metod, metody jsou využitelné k separaci hojně se vyskytujících fosfoproteinů a fosfopeptidů. Naopak za výhodu těchto metod lze považovat nahrazení záporně nabitých fosfátových skupin neutrální funkční skupinou. Nově modifikovaný protein/peptid se ve srovnání s původním fosfoproteinem/ fosfopeptidem lépe ionizuje a také ochotněji fragmentuje, což usnadňuje identifikaci fosforylačních míst hmotnostní spektrometrií [5].

1.5.3 Chromatografické metody používané při separaci fosfoproteinů a fosfopeptidů

1.5.3.1 Iontově výměnná chromatografie

Při iontově výměnné chromatografii jsou proteiny/peptidy separovány na základě jejich rozdílného náboje. Proteiny a peptidy jsou amfolyty, jejichž náboj je závislý na pH. Při pH odpovídajícím pI proteinu nejsou proteiny nabitě a neinteragují s nabitými sorbenty. Pokud je pH nižší než pI proteinu, je protein kladně nabit a adsorbuje se na katexy. V opačném případě, pokud je pH vyšší než pI proteinu, je protein ve formě aniontu a

adsorbuje se na anex. Adsorbované proteiny/ peptidy jsou z ionexu uvolněny změnou pH nebo iontové síly.

Substituce neutrální hydroxylové skupiny serinu, threoninu a tyrosinu negativně nabitou fosfátovou skupinou způsobuje posun pI proteinů a peptidů do kyselé oblasti. Této změny pI se využívá při separaci fosforylovaných proteinů a peptidů od nefosforylovaných iontově výměnnou chromatografií [6].

Fosfátové skupiny fosfopeptidů mají silný negativní náboj. Fosfopeptidy tedy se silnými katexy reagují slaběji než nefosforylované peptidy. Fosfopeptidy jsou z katexů eluovány v počátečních frakcích, a to umožňuje jejich separaci od nefosforylovaných peptidů, které s katexy interagují silněji. Nicméně použití katexů při separaci fosfopeptidů má i svá určitá omezení. Separace na katexech není zcela specifická pro separaci fosfopeptidů, protože v prvních elučních frakcích mohou být kromě fosfopeptidů přítomny i nefosforylované peptidy s vyšším obsahem negativně nabitých skupin. Výhodné je spojení separace na katexech s afinitní chromatografií na imobilizovaných kovových iontech, která následuje po separaci na katexech. Další nevýhodou je, že fosfopeptidy s více fosfátovými skupinami mají silný negativní náboj a na katexy se neabsorbují.

K izolaci fosfopeptidů z proteolytických směsí peptidů mohou být použity i silné anexy. Na anexech jsou naopak fosfopeptidy díky silnému zápornému náboji zadržovány silněji než ostatní peptidy. Zatímco fosfopeptidy jsou silně zadržovány na anexu, většina nefosforylovaných peptidů je buď přítomna v promývací frakci nebo v prvních elučních frakcích. Bylo zjištěno, že čím víc fosfátových skupin fosfopeptid obsahuje, tím později je z anexu při iontově výměnné chromatografii eluován. Toho se využívá při frakcionaci fosfopeptidů na základě jejich rozdílné interakce s anexy [7].

1.5.3.2 Afinitní chromatografie využívající interakci s oxidy kovů

Afinitní chromatografie na oxidech kovů je metoda využívající vysoké afinity fosfátových skupin k určitým oxidům kovů. V současné době jsou k afinitní separaci fosfopeptidů hojně využívány nosiče na bázi TiO_2 . Afinitní chromatografie na TiO_2 byla použita již v roce 1990 k selektivní izolaci organických fosfátů [20]. K separaci fosfopeptidů je metoda užívána v posledních letech. Pinkse a kol. [21] popsali metodu pro selektivní separaci fosfopeptidů z komplexních směsí založenou na dvojrozměrné chromatografii ve spojení s hmotnostní analýzou. V prvním rozměru je zapojena

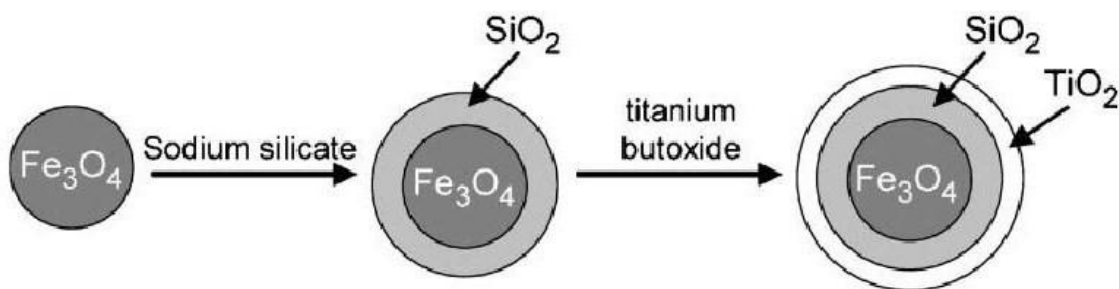
předkolonka naplněná TiO_2 a za ní následuje kolonka s reverzní fází. Fosfopeptidy jsou adsorbovány v kyselém pH na kolonku naplněnou TiO_2 , zatímco nefosforylované peptidy projdou až na kolonku s reverzní fází, ze které jsou postupně eluovány a analyzovány na hmotnostním spektrometru. Poté jsou z první kolonky eluovány fosfopetidy zvýšením pH, zkoncentrovány na kolonce s reverzní fází a analyzovány na hmotnostním spektrometru.

Stejně jako u metody IMAC patří mezi hlavní limitující faktory této metody adsorpce nefosforylovaných peptidů bohatých na aminokyseliny s karboxylovými skupinami v postranním řetězci. Snížení interakcí nefosforylovaných peptidů s TiO_2 nosičem bylo docíleno přidáním kyseliny 2,5-dihydrohybenzoové (DHB) do adsorpčního pufru. Došlo k zvýšení selektivity a citlivosti detekce fosfopeptidů. Srovnatelný efekt jako DHB mají i další substituované aromatické karboxylové kyseliny: kyselina salicylová a kyselina ftalová [22].

Kromě TiO_2 byly k separaci fosfopeptidů využity i další oxidy kovů: oxid zirkoničitý (ZrO_2), oxid hlinitý (Al_2O_3) a oxid niobičitý (Nb_2O_5) [8].

Kweon a kol. [23] zjistili, že afinitní chromatografie na ZrO_2 poskytuje srovnatelnou selektivitu pro vazbu fosfopeptidů jako TiO_2 . Zatímco ZrO_2 má větší selektivitu k fosfopeptidům s jednou fosfátovou skupinou, TiO_2 přednostně váže vícenásobně fosforylované peptidy. Kombinací afinitní separace na TiO_2 a ZrO_2 lze docílit většího počtu izolovaných fosfopeptidů.

V poslední době se k separaci fosfopeptidů také používají magnetické částice pokryté oxidy kovů (TiO_2 , ZrO_2 , Al_2O_3 a Ga_2O_3). Magnetické částice (Fe_3O_4) jsou nejprve pokryty tenkou vrstvou SiO_2 a tato vrstva je teprve pokryta oxidy kovů reakcí s butoxidem titaničitým, butoxidem zirkoničitým, izopropylátem hlinitým nebo izopropylátem galitým (obr. 1.3) [8]. Výhodou těchto magnetických částic je možnost separace fosfopeptidů interakcí s oxidy kovů na povrchu těchto částic a snadná manipulace s použitím externího magnetického separátoru [24].



Obr. 1.3: Příprava magnetických částic pokrytých oxidem titaničitým. Upraveno podle [8].

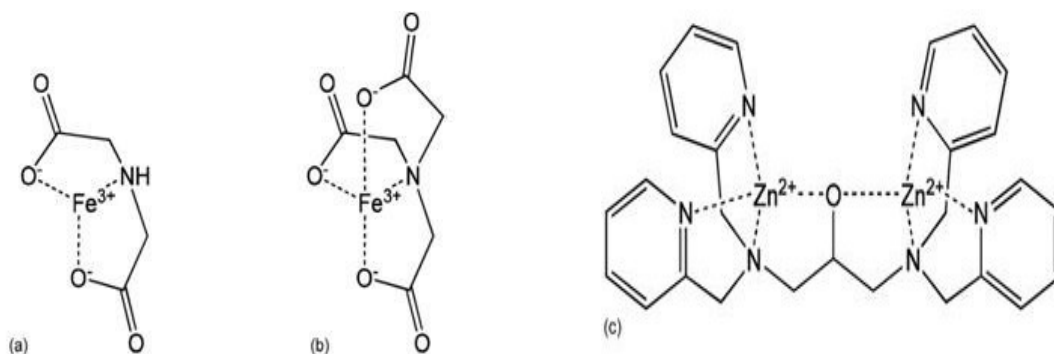
1.5.3.3 Afinitní chromatografie na sorbentech s imobilizovanými kovovými ionty

Afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech (IMAC) představuje jednu z nejběžnějších a nejpoužívanějších technik pro selektivní izolaci fosfopeptidů a fosfoproteinů z komplexních směsí. Porath a kol. [25] představili metodu IMAC již v roce 1975. V současné době je tato metoda nejčastěji používána k separaci fosfopeptidů z proteolytické směsi před analýzou hmotnostním spektrometrem [26, 27]. Metodu lze použít pro izolaci peptidů a proteinů fosforylovaných na serinových, threoninových i tyrosinových zbytcích [5].

Metoda je založena na vysoké afinitě záporně nabitě fosfátové skupiny k iontům kovů. Ionty kovů jsou imobilizovány na nosič pomocí vázaného chelátu. Nejčastěji používanými cheláty jsou iminodioctová kyselina (IDA) a nitrilotrioctová kyselina (NTA), které bývají navázány na chromatografický sorbent, membránu nebo magnetické částice [5, 6, 8]. IDA vytváří s kovem tři koordinačně-kovalentní vazby, zbylá tři koordinační místa jsou dostupná pro vazbu fosfátu (viz obr. 1.4a), zatímco NTA vytváří s kovem čtyři koordinačně-kovalentní vazby a pro vazbu fosfátu zbývají dvě koordinační místa (viz obr. 1.4b) [6].

Nejčastěji se k obohacení fosfopeptidů a fosfoproteinů používají komplexy Fe(III) -NTA nebo Fe(III) -IDA, některé studie uvádějí, že komplex Fe(III) -NTA vykazuje vyšší selektivitu při separaci fosfopeptidů než komplex Fe(III) -IDA [19]. K separaci fosfopeptidů se kromě imobilizovaných železitých iontů používají i další kovové ionty vykazující afinitu k fosfátu: galité, zirkoničité a hlinité [28, 29, 30]. V nedávné době byl navržen dvoujaderný zinečnatý komplex (viz obr. 1.4c) označený „Phos-tag“ [31], jehož hlavní výhodou je možnost izolace fosfoproteinů a fosfopeptidů ve fyziologickém pH,

zatímco na železité a galité ionty jsou fosfopeptidy a fosfoproteiny adsorbovány v kyselém pH (2,0 – 3,5) [28].



Obr. 1.4: a) iminodioctová kyselina (IDA) s imobilizovaným Fe(III) iontem ; b) nitrilotrioctová kyselina (NTA) s imobilizovaným Fe(III) iontem; c) „Phos-tag“ [6]

Schopnost jednotlivých kovových iontů adsorbovat fosfopeptidy a fosfoproteiny se může lišit. Některé studie uvádějí, že imobilizované železité ionty jsou schopny adsorbovat více fosforylovaných peptidů než imobilizované galité ionty [32]. Naopak jiné studie zjistily vyšší selektivitu imobilizovaných galitých iontů [28] a také bylo zjištěno, že na imobilizované galité ionty se adsorbuje více fosfopeptidů než na imobilizované železité ionty [33]. Sykora a kol. [34] pozorovali vyšší selektivitu imobilizovaných galitých iontů k fosfopeptidům s jednou fosfátovou skupinou, zatímco u imobilizovaných železitých iontů pozorovali vyšší selektivitu k vícenásobně fosforylovaným peptidům.

Celý proces separace fosfopeptidů nebo fosfoproteinů zahrnuje selektivní adsorpci fosfopeptidů nebo fosfoproteinů na sorbent, odstranění neadsorbovaných peptidů nebo proteinů promytím sorbentu a eluci zachycených fosfopeptidů nebo fosfoproteinů zvýšením pH nebo přidavkem fosfátu [5, 8, 28].

Hlavním limitujícím faktorem metody IMAC je adsorpce nefosforylovaných peptidů bohatých na aminokyseliny s karboxylovými skupinami, což výrazně snižuje selektivitu separačního postupu [26, 28, 32, 35]. Adsorpci nefosforylovaných peptidů obsahujících karboxylové skupiny lze ovlivnit vhodnou volbou pH adsorpčního pufru [28, 33, 36, 37, 38]. Některé studie prokázaly, že elektrostatické interakce mezi kovovým iontem a karboxylovou skupinou postranního řetězce aminokyseliny lze minimalizovat zvýšením iontové síly při adsorpci [33], ale v jiných studiích nebylo toto snížení adsorpce

nefosforylovaných peptidů a proteinů pozorováno [37, 39]. Další možností, jak zabránit vazbě nefosforylovaných peptidů/proteinů, je esterifikace karboxylových skupin [35]. Adsorpci nefosforylovaných peptidů bohatých na aminokyseliny s karboxylovými skupinami se na Ga(III)-IMAC sorbentu podařilo potlačit také použitím endoproteázy Glu-C při štěpení proteinů místo běžně používaného trypsinu. Glu-C štěpí peptidové vazby za zbytkem kyseliny glutamové a kyseliny asparagové, takže každý vzniklý peptid obsahuje pouze jednu karboxylovou skupinu. Použití endoproteázy Glu-C může tedy zásadně snížit všechny interakce nefosforylovaných peptidů s IMAC sorbentem, které jsou zprostředkovány dvěma a více volnými karboxylovými skupinami peptidu [40].

IMAC byla použita v různých modifikacích (různé ionty kovů, cheláty, adsorpční podmínky, eluční podmínky), obměňovat lze i sorbent. Nejběžněji používanými sorbenty při IMAC jsou silikagel, materiály na porézní, neporézní nebo polymerní bázi jako je agarosa, sepharosa nebo zesíťovaný poly(styrene-divinylbenzen) [41]. V posledních letech je věnována stále větší pozornost kombinaci magnetické a afinitní separace [42, 43, 44].

Bylo připraveno mnoho typů magnetických částic o mikrometrovém nebo nanometrovém průměru, které se v různých modifikacích používají k separaci proteinů a peptidů z komplexních biologických směsí. Ve spojení s hmotnostní analýzou představuje separace na magnetických sorbentech velmi citlivou a rychlou metodu pro identifikaci proteinů a peptidů z biologických vzorků, především díky jednoduché manipulaci s použitím externího magnetu, vysoké vazebné kapacity a malým rozměrům [45]. IMAC na magnetických sorbentech se používá k separaci fosfoproteinů a především fosfopeptidů [46, 47, 7].

1.6 Analýza fosfopeptidů a fosfoproteinů hmotnostní spektrometrií

K detekci fosfátové skupiny v molekule proteinu či peptidu a k přesnému určení místa fosforylace se dnes téměř výhradně používá hmotnostní spektrometrie [1].

Hmotnostní spektrometrie poskytuje informaci o molekulové hmotnosti, tedy vlastnosti, která je charakteristická pro každé chemické individuum. Každá fosfátová skupina navázaná na serin, threonin nebo tyrosin vede ke zvýšení molekulové hmotnosti o 80 Da. Změření molekulové hmotnosti intaktního fosfoproteinu se znalostí molekulové

hmotnosti nemodifikovaného proteinu nebo po defosforylaci fosfoproteinu fosfatázou umožní určení průměrného počtu fosfátů navázaného na polypeptidový řetězec [5].

K analýze fosfoproteinů a fosfopeptidů se nejčastěji používají ionizační techniky MALDI („matrix-assisted laser desorption/ionization“) a ESI („electrospray ionization“). Výhoda ESI spočívá především v možnosti přímého spojení s RPLC, což umožňuje efektivnější separaci fosfopeptidů. Hmotnostní analyzátoři na principu MALDI-TOF se obvykle používají k analýze méně komplexních vzorků.

K analýze fosforylačních míst proteinů, jsou proteiny nejprve štěpeny proteázou (např. trypsin) a fosforylační místa jsou poté určena hmotnostní analýzou peptidů obsažených ve vzniklé proteolytické směsi.

Obtíže při detekci fosfopeptidů MALDI-TOF MS analýzou způsobuje nižší ionizační schopnost fosfopeptidů. K zvýšení detekční citlivosti fosfopeptidů mohou být fosfopeptidy chemicky modifikovány. Chemická modifikace je však často nespecifická a zavedení chemických činidel vyžaduje zavedení dalších purifikačních kroků. Bylo zjištěno, že určité přísady v MALDI matrici mohou významně zlepšit ionizační schopnost fosfopeptidů: používá se např. přídavek 1% kyseliny fosforečné do matrice 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny. V proteolytické směsi peptidů může být ionizace fosfopeptidů v nadbytku nefosforylovaných peptidů potlačena. Izolace fosfopeptidů z proteolytických směsí před MALDI-TOF MS analýzou je proto nezbytným předpokladem k jejich úspěšné detekci. K izolaci fosfopeptidů z proteolytických směsí peptidů se často používá: afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech, afinitní chromatografie na oxidech kovů nebo iontově výměnná chromatografie [48].

Bylo vyvinuto několik metod využívajících hmotnostní spektrometrie pro detekci fosfopeptidů. Vysoce specifickou metodu detekce fosfopeptidů představuje využití speciálních skenovacích funkcí tandemových hmotnostních spektrometrů jako je sken neutrálních ztrát a sken rodičovského iontu. Nejčastěji využívanými tandemovými hmotnostními spektrometry jsou trojnásobný kvadrupól, kvadrupól s analyzátořem z doby letu nebo iontová past [5]. Při skenu neutrálních ztrát se měření provádí v režimu kladných iontů. Peptidy fosforylované na serinových nebo threoninových zbytcích po kolizně indukované disociaci podléhají β -eliminaci vedoucí k neutrální ztrátě H_3PO_4 (-98 Da). Z iontu vykazujícího neutrální ztrátu H_3PO_4 je získáno MS/MS spektrum poskytující informaci o lokalizaci fosforylace. Původní fosfoserin je pak v sekvenci fosfopeptidu identifikován jako dehydroalanin (69 Da) a původní fosfothreonin jako dehydroamino-2-

máselná kyselina (83 Da). Fosfotyrosiny nepodléhají β -eliminaci, ale v režimu kladných iontů dochází k tvorbě imoniových iontů o m/z 216,043. Při skenu rodičovského iontu se měření provádí v režimu záporných iontů. Za podmínek kolizně indukované disociace poskytují peptidy fosforylované na serinových, threoninových a tyrosinových zbytcích v alkalickém prostředí diagnostický ion PO_3^- (79 Da), který dovoluje jejich vysoce specifickou detekci pomocí skenu rodičovského iontu [1, 5].

2. CÍL PRÁCE

Úkolem předkládané diplomové práce bylo vypracování spolehlivých metod pro studium fosforylačních míst fosfopeptidů a fosfoproteinů. Vývoj a optimalizace metod pro selektivní separaci fosfopeptidů a fosfoproteinů ze směsí peptidů nebo proteinů představuje nezbytný základ jejich úspěšné analýzy. Cílem předkládané diplomové práce bylo vypracovat dva principiálně rozdílné metodické přístupy pro studium fosforylace proteinů:

- 1.) Separace pomocí IMAC na nových magnetických sorbentech s imobilizovanými kovovými ionty a následnou hmotnostní analýzou.
- 2.) Imunochemické metody s využitím slepičích protilátek specifických pro O-fosforyl-L-serin imobilizované na novém magnetickém sorbentu využít k detekci a separaci fosfoproteinů.

Práce byla rozdělena do dvou částí zabývajících se jednotlivými metodickými přístupy.

K řešení prvního úkolu bylo třeba:

- Na nové magnetické částice P(HEMA-co-GMA) modifikované iminodiotovou kyselinou imobilizovat kovové ionty. Takto připravený magnetický sorbent použít k separaci fosfopeptidů z proteolytických směsí peptidů modelových fosfoproteinů lišících se svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi a obsahem fosfátových skupin (modelové fosfoproteiny: prasečí pepsin A, α -kasein).
- Optimalizovat adsorpční a eluční podmínky IMAC separace na připravených magnetických sorbentech k dosažení co nejlepší selektivity separačního postupu.
- Fosfopeptidy separované IMAC metodou na připravených magnetický sorbent analyzovat MALDI-TOF MS analýzou a fosforylační místa ověřit MALDI-TOF MS/MS analýzou.

K řešení druhého úkolu bylo třeba:

- Slepičí protilátky specifické pro O-fosforyl-L-serin, připravené ve firmě Hena s.r.o., izolovat pomocí afinitní chromatografie.

- S použitím imunochemické metody (ELISA) ověřit specifitu získaných slepičích protilátek na připravených syntetických antigenech a modelových fosfoproteinech.
- Slepičí protilátky specifické pro O-fosforyl-L-serin imobilizovat na magnetické částice P(HEMA-*co*-GMA) a použít je k separaci a analýze fosfoproteinů.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použitý materiál a chemikálie

3.1.1 Chemikálie

α -kasein, prasečí pepsin A, α -chymotrypsin z hovězího pankreatu, chlorid železitý, chlorid galitý, acetonitril, kyselina trifluoroctová, jodacetamid, dithiotreitol, kyselina fosforečná, hydroxid amonný, hovězí sérový albumin (BSA), hydrohenfosforečnan diamonný, hydrogenuhlíčan amonný, TEMED, akrylamid, N,N'-methylenbis(akrylamid), merkptoethanol, tris(2-karboxyethyl)fosfin, Coomassie brilliant blue R-250, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonát), *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*-ethylkarbodiimid a O-fosforyl-L-serin byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika). CNBr-aktivovaná Sepharosa 4B byla zakoupena od firmy Pharmacia, Fine Chemicals (Uppsala, Švédsko). Trypsin gold byl zakoupen u společnosti Promega (Madison, WI, USA). Glycin byl zakoupen u společnosti Serva Feinbiochemica (Heidelberg, Německo). Kalibrační standard peptidů a kyselina 2,5-dihydroxybenzoová byly zakoupeny u Bruker Daltonics (Brémy, Německo). Sekundární králičí protilátka proti slepičí protilátce značená křenovou peroxidázou (RACHi) byla zakoupena od firmy Hena s.r.o. (Praha, Česká republika). Marker molekulových hmotností Dual Color Precision Plus Protein Standards byl zakoupen od firmy BioRad (Praha, Česká republika).

Není-li uvedeno jinak, ostatní chemikálie byly zakoupeny od IPL (Uherský Brod, Česká republika).

3.1.2 Magnetické částice P(HEMA-co-GMA) obsahující vázanou IDA

Neporézní hydrofilní poly(2-hydroxyethyl metakrylát-co-glycidyl metakrylátové) magnetické částice P(HEMA-co-GMA) modifikované iminodioctovou kyselinou byly připraveny na Ústavu makromolekulární chemie, Akademie věd České republiky Dr. Horákem. Připravují se disperzní kopolymerací 2-hydroxyethyl metakrylátu (HEMA) s glycidyl metakrylátem (GMA) v přítomnosti koloidních oxidů železa.

3.1.3 Slepí protilátky IgY

Imunoglobulinová frakce z vaječných žloutků od slepic imunizovaných proti KLH (Keyhole limpet hemocyanin) obsahující vázaný O-fosforyl-L-serin byla připravena ve firmě Hena, s.r.o. (Praha, Česká republika). Hapten (O-fosforyl-L-serin) byl navázán na maleylovaný derivát hemocyaninu pomocí karbodiimidové reakce.

3.2 Přístroje

- Hmotnostní spektrometr Autoflex II MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics, Brémy, Německo)
- Spektrofotometr s diodovým polem 8453 (Hewlett Packard, Palo Alto, California, USA)
- Manualní magnetický separátor (Bruker Daltonics, Brémy, Německo)
- Spektrofotometr: Multiscan Microplate Reader MCC/340 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- K temperování byly použity přístroje: AccuBlock Digital Dry Bath (Labnet International, Oakham, UK) a Incubator with Orbital Shaker SI50 (Stuart Scientific, Stone, UK)
- Mikrocentrifuga MiniSpin (Eppendorf, Hamburk, Německo)
- Minishaker MS1 (IKA, Staufen, Německo)
- Aparatura na elektroforézy: Mini-PROTEAN III (BioRad, Praha, Česká republika)
- Zdroj pro elektroforézu: Power PAC 3000 (BioRad, Praha, Česká republika)
- Milli-Q systém pro přípravu vody (Millipore, Billerica, MA, USA)

3.3 Metody studia fosfoproteinů pomocí IMAC separace na magnetických sorbentech a MS analýzy

3.3.1 Proteolytické štěpení modelových fosfoproteinů

3.3.1.1 Štěpení α -kaseinu trypsinem

Chemikálie a roztoky:

- α -kasein (1mg/ml v 0,025 M NH_4HCO_3)
- 0,025 M NH_4HCO_3
- roztok trypsinu v 0,025 M NH_4HCO_3 (0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
- koncentrovaná kyselina trifloroctová (TFA)

Postup:

Reakční směs byla připravena smícháním následujících roztoků: roztok α -kaseinu (250 μl ; 1 mg/ml), 0,025 M NH_4HCO_3 (2,25 ml) a roztok trypsinu (25 μl ; 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Reakční směs byla za stálého třepání inkubována 18 hodin při 37°C. Štěpení bylo ukončeno inaktivací trypsinu okyselením reakční směsi koncentrovanou TFA na pH 4.

3.3.1.2 Štěpení prasečího pepsinu A α -chymotrypsinem

Chemikálie a roztoky:

- 0,05 M NH_4HCO_3
- 0,1 M NH_4HCO_3
- 0,2 M dithiothreitol (DTT) v 0,1 M NH_4HCO_3
- 1M iodoacetamid (IAA) v 0,1 M NH_4HCO_3
- roztok prasečího pepsinu A (1 mg/ml) v 0,05 M NH_4HCO_3
- roztok α -chymotrypsinu (1 mg/ml) v 0,1 M NH_4HCO_3
- koncentrovaná TFA

Postup:

K roztoku prasečího pepsinu A (1,65 ml; 1 mg/ml) byl přidán 0,2 M DTT (82,5 µl) a redukce disulfidických můstků probíhala 10 min při 95°C. Po zchladnutí byl přidán roztok 1M IAA (66 µl), sloužící k alkylaci cysteinů. Reakce probíhá 45 min ve tmě při pokojové teplotě. Alkylace byla zastavena přidáním 0,2 M roztoku DTT (330 µl) a inkubací po 45 min při pokojové teplotě. Poté byl do roztoku přidán roztok α -chymotrypsinu (1 mg/ml; 165 µl). Hmotnostní poměr α -chymotrypsinu k pepsinu byl 10:1. Směs byla inkubována při teplotě 37°C 16 až 18 hod. Reakce byla zastavena okyselením inkubační směsi koncentrovanou TFA na pH 4.

Pro kontrolou štěpení byl paralelně proveden slepý pokus. Postup přípravy vzorku byl stejný jako v předchozím případě, pouze místo roztoku pepsinu bylo použito odpovídající množství 0,05 M NH_4HCO_3 .

3.3.2 Přechistění a odsolení frakce peptidů na špičkách s C18 fází

Byly použity špičky PerfectPure C18 Tip (Eppendorf, Německo).

Roztoky:

- roztok **A**: 50% acetonitril (ACN)
- roztok **B**: 0,1% TFA
- roztok **C**: 0,1% TFA obsahující 50% ACN
- vzorek: prasečí pepsin A štěpený α -chymotrypsinem

Postup:

C18 špička se v následujícím pořadí postupně promyje:

- 10 x 10 µl roztoku A
- 10 x 10 µl roztoku B
- 1 x 10 µl vzorku
- 10 x 10 µl roztoku B
- 2 x 2 µl roztoku C (eluce)

Eluáty byly podrobeny MALDI-TOF MS analýze pro kontrolu správného naštěpení vzorku.

3.3.3 Separace fosforylovaných peptidů pomocí IMAC na magnetických sorbentech s imobilizovanými Fe(III) a Ga(III) ionty

3.3.3.1 Sycení magnetických sorbentů Fe(III) a Ga(III) ionty

K sycení byly použity magnetické částice označené P(HEMA-co-GMA) s navázanou iminodioctovou kyselinou (IDA). Byla použita šarže obsahující 0,399 mmol -COOH skupin/g magnetických částic.

Bylo odebráno 50 mg magnetických částic, přidán 1 ml destilované vody a částice byly 24 hodin třepány při pokojové teplotě. Po promíchání byl na magnetickém separátoru odstraněn roztok. Částice byly nejprve promyty: 5 x 1000 μ l 0,05 M EDTA- Na_2 obsahující 1M NaCl a 5 x 1000 μ l destilované vody. Částice byly nasyceny promytím 5 x 1000 μ l sytícího roztoku (0,1 M FeCl_3 nebo 0,1 M GaCl_3). Pro odstranění nenavázaných nebo slabě navázaných iontů byly magnetické částice ještě promyty 5 x 1000 μ l destilované vody a nakonec 5 x 1000 μ l 1M NaCl. Nasycené magnetické částice byly doplněny do 1 ml 0,05 M acetátovým pufrem o pH 4,0 a pro další použití skladovány při 4°C.

3.3.3.2 Obecný postup při IMAC separaci

S magnetickými částicemi se pracuje na magnetickém separátoru. Po promíchání magnetických částic s daným roztokem je roztok odebrán pipetou.

Při IMAC separaci bylo obecně postupováno tak, že bylo odebráno 10 μ l suspenze nasycených magnetických částic a v prvním kroku byly magnetické částice nejprve promyty 5 x 10 μ l elučního činidla. Dále byly magnetické částice promyty 5 x 10 μ l adsorpčního pufru (o daném pH, iontové síle). Poté bylo aplikováno 10 μ l vzorku (proteolytické štěpy z α -kaseinu nebo prasečího pepsinu A). Nenavázané peptidy byly odstraněny promytím 5 x 10 μ l adsorpčního pufru. Navázané peptidy byly eluovány 3 x 5 μ l elučního roztoku.

Od aplikace vzorku byly všechny frakce sbírány (nenavázaná frakce - NPV, promývací frakce P1 - P5 , eluáty - E) pro následnou MALDI-TOF MS analýzu.

3.3.3.3 Optimalizace adsorpčních a elučních podmínek

Byly testovány následující adsorpční pufrы: 0,1%; 0,5%; 3,0% a 6,0% kyselina octová obsahující NaCl (0; 0,1; 0,5 nebo 1 M) a acetonitril (0% nebo 30%); dále 0,025 M acetátový pufr o pH 3,5; 4,0; 5,0 a 6,0 obsahují NaCl (0; 0,1; 0,5 nebo 1M) a acetonitril (0% nebo 30%); 0,025 M glycin-HCl pufr o pH 2,5; 3,0 a 3,5 obsahující NaCl (0; 0,1; 0,5 nebo 1 M) a acetonitril (0% nebo 30%).

Byla testována následující eluční činidla: hydroxid amonný (5 mM), hydrogenfosforečnan amonný (0,2; 0,5 a 1M), kyselina fosforečná (0,1%; 1,0% a 10 %) obsahující acetonitril (0 nebo 50%).

3.3.4 MALDI-TOF MS a MALDI-TOF MS/ MS analýza

Měření na hmotnostním spektrometru pro účely této práce provedli RNDr. Petr Přikryl, Ph.D. a Bc. Jana Vávrová.

Analýza peptidů po IMAC byla provedena na MALDI-TOF/TOF (matrix assisted laser desorption ionization – time-of-flight/time-of-flight) hmotnostním spektrometru Autoflex II TOF/TOF (Bruker Daltonics, Brémy, Německo). Tento přístroj je vybaven dusíkovým laserem o vlnové délce 337 nm a FlexControl softwarem. Pro zpracování dat byl použit software FlexControl. Přístroj byl před měřením externě kalibrován kalibračním standardem peptidů (Bruker Daltonics, Brémy, Německo) obsahujícím angiotensin I, angiotensin II, substanci P, bombesin, ACTH (1-17), ACTH (18-39) a somatostatin 28.

3.3.4.1 Aplikace vzorků na MALDI terčík

MALDI-TOF MS analýze byly podrobeny proteolyticky naštěpené proteiny (α -kasein a prasečí pepsin A) aplikované na IMAC magnetické sorbenty a frakce získané během IMAC (nenavázaná frakce - NPV, promývací frakce P1 - P5 a eluáty - E).

Na AnchorChip terčík (Bruker Daltonics, Brémy, Německo) bylo napipetováno 0,5 μ l roztoku matrice (5 mg 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny rozpuštěné v 1 ml 0,1% TFA obsahující 1% kyselinu fosforečnou a 30% ACN) a ponecháno při pokojové teplotě odpařit do sucha. Poté bylo přidáno 0,5 μ l vzorku nebo standardu a také bylo ponecháno odpařit do sucha při pokojové teplotě. Terčík byl následně vložen do hmotnostního spektrometru a peptidy byly podrobeny MS nebo MS/MS analýze.

3.3.4.2 Identifikace peptidů

Naměřené hodnoty m/z peptidových iontů byly porovnány s teoretickými hodnotami získanými *in silico* štěpením daných proteinů příslušnou proteázou a to následujícím způsobem. Sekvence α -kaseinu a prasečího pepsinu A byly získány z ExPASy proteomického serveru (Swiss Institute of Bioinformatics, Lausanne, Švýcarsko). Program mMass (verze 2,4) byl použit k *in silico* štěpení α -kaseinu trypsinem a prasečího pepsinu A α -chymotrypsinem. Získané seznamy sekvencí a hodnot m/z teoretických peptidů byly programem mMass porovnány s naměřenými daty ke zjištění shod. Sekvence takto identifikovaných peptidů byly ověřeny MS/MS analýzou. Peptidy získané tandemovou hmotnostní spektrometrií byly identifikovány s použitím programů FlexAnalysis a BioTools (Bruker Daltonics, Brémy, Německo) spolu s vyhledávacím programem Mascot (Matrix Sciences, Londýn, UK) a databází Swiss-Prot (SIB, Ženeva, Švýcarsko). Tolerance hmotnosti peptidu byla nastavena na 150 ppm, tolerance tandemové hmotnosti na 0,5 Da a počet možných vynechaných štěpení enzymem („missed cleavage“) na 3.

3.4 Metody studia fosfoproteinů pomocí slepičích protilátek specifických pro fosfoserin

3.4.1 Afinitní izolace slepičích protilátek IgY na sloupci α -kasein-Sepharosy

3.4.1.1 Imobilizace α -kaseinu na CNBr-aktivovanou Sepharosu

CNBr-aktivovaná Sepharosa 4B (3 g) byla přelita 1 mM HCl (asi 100 ml) a ponechána 1 hod bobtnat při pokojové teplotě. Poté byl gel přenesen na fritu a promyt 1 mM HCl (100 ml). Po tomto kroku byly odebrány 3 ml gelu, které sloužily jako výchozí množství pro další experimenty.

α -kasein - ligand (30 mg) byl rozpuštěn v 6 ml vazného pufru (0,1M NaHCO₃ obsahující 0,5 M NaCl o pH 8,3; poměr gel: pufr 1 : 2). Gel byl na fritě promyt vazným pufrem (15 ml) a smíchán s roztokem ligandu. Suspense byla třepána přes noc při 4°C. Zablokování případných neobsazených aktivních skupin bylo provedeno glycinem. K usazenému gelu byl přidán 0,2 M roztok glycinu o pH 8,0 (5 ml) a blokování probíhalo za třepání, při laboratorní teplotě po dobu 2 hod.

Gel byl přenesen na fritu a postupně promyt 100 ml následujících roztoků: voda, 0,15 M NaCl, 1 M NaCl, 0,05 M diethylamin a 0,15 M NaCl (v tomto roztoku byl gel uchován pro další použití).

3.4.1.2 Afinitní purifikace protilátek IgY na Sepharose s imobilizovaným α -kaseinem

Slepičí protilátky IgY připravené ve firmě Hena s.r.o. (Praha, Česká republika) byly izolovány pomocí afinitní chromatografie na imobilizovaném α -kaseinu.

Sepharosa s imobilizovaným α -kaseinem (3 ml) byla smíchána s roztokem slepičích protilátek IgY (10 ml; 25 mg/ml). Protilátky byly s modifikovanou Sepharosou inkubovány přes noc (asi 18 hodin) za mírného míchání při 4°C.

Po inkubaci s protilátkou byl gel přenesen do kolonky a roztok obsahující nenavázané protilátky (NPV) byl uchován. V této frakci byla změřena absorbance při 280 nm a odhadnuta koncentrace proteinu podle vzorce: $c = 1,094 \cdot A_{280} \cdot \text{ředění}$ [mg/ml]. Poté byl gel promýván TBS (0,05 M Tris/HCl obsahující 0,15 M NaCl, pH 7,4) a v odebíraných frakcích byla měřena absorbance při 280 nm. Kolonka byla promývána tak dlouho, dokud absorbance neklesla téměř k 0 (celkem 60 ml TBS). Následovalo promývání afinitního nosiče 0,05 M Tris/HCl obsahujícím 1 M NaCl, pH 7,4. Kolonka byla promývána tak dlouho, až absorbance měřená v odebíraných frakcích (po 1,5 ml) při 280 nm klesla na nulu (asi 10 ml 0,05 M Tris/HCl obsahujícího 1 M NaCl, pH 7,4). Frakce s nejvyšší absorbancí byly spojeny.

K eluci specificky adsorbovaných protilátek IgY byl použit 0,05 M diethylamin o pH 11,5. Do mikrozku mávek obsahujících 340 μ l 1 M citrátového pufru o pH 6,5, sloužícího k neutralizaci pH eluátu na 7,2 až 7,4, byly jímány 1 ml frakce vytékající z kolonky. V každé eluční frakci bylo proměřeno spektrum v rozmezí 200 až 400 nm. Jako srovnávací vzorek bylo použito: 340 μ l 1 M citrátového pufru o pH 6,5 + 1000 μ l 50 mM diethylaminu o pH 11,5. Frakce vykazující nejvyšší hodnotu absorbance při 280 nm byly spojeny.

Spojené frakce (po eluci a po promytí 0,05M Tris/HCl obsahující 1M NaCl) byly dialyzovány přes noc při 4 °C proti 10 l TBS obsahujícím 0,1% azid sodný. Po dialýze byla opět proměřena spektra v rozsahu 200 až 400 nm. Jako srovnávací vzorek bylo použito TBS obsahující 0,1% azid sodný. Z hodnoty absorbance při 280 nm byla v obou vzorcích odhadnuta koncentrace proteinu.

Sloupec byl promyt asi 50 ml TBS a asi 10 ml TBS obsahujícího 0,1% azid a uchován v chladu pro další použití.

3.4.2 ELISA test - zhodnocení specifity separovaných protilátek IgY

3.4.2.1 Příprava syntetického antigenu pro ELISA testy

V 0,05 M uhličitanovém pufru o pH 9,5 (10 ml) byl rozpuštěn BSA (40 mg). Na ledu byl k roztoku BSA po kapkách přidán 1 M roztok anhydridu kyseliny maleinové v dioxanu (1,5 ml), pH bylo upraveno 1% NaOH na 9,0. Směs byla inkubována asi 5 minut na ledu a poté dialyzována při 4°C přes noc proti 0,15 M NaCl.

Po dialýze byl k roztoku maleylovaného derivátu BSA (5 ml) přidán O-fosforyl-L-serin (150 mg) a *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*-ethylkarbodiimid (150 mg). Směs byla třepána přes noc při pokojové teplotě a poté dialyzována proti destilované vodě. Druhá polovina dialyzovaného vzorku byla použita jako kontrola. Oba vzorky – maleylovaný BSA (MA-BSA) a maleylovaný BSA s navázaným fosforyl-L-serinem (p-Ser-MA-BSA) byly lyofilizovány a podrobeny hmotnostní analýze.

3.4.2.2 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

a) Imobilizace antigenů

Na mikrotitrační destičku F16 Polysorp Unfra (Roskilde, Dánsko) byly imobilizovány následující antigeny: přirozené fosfoproteiny α -kasein a ovalbumin, přítomný ve vaječném bílku, a také připravený syntetický antigen: maleylovaný BSA s navázaným O-fosforyl-L-serinem (p-Ser-MA-BSA). Jako kontrolní antigeny byly použity: maleylovaný BSA (MA-BSA), BSA(I) a BSA(II). BSA (I) – BSA použitý při přípravě syntetických antigenů p-Ser-MA-BSA a MA-BSA, BSA (II) – BSA používaný při blokování.

Byly připraveny zásobní roztoky všech antigenů o koncentraci 1 mg/ml v TBS. Jako vazný pufr byl použit 0,05 M uhličitanový pufr o pH 9,6. Do 5 ml vazného pufru bylo napipetováno 20 μ l roztoku antigenu o koncentraci 1 mg/ml (výsledná koncentrace antigenu byla 4 μ g/ml). Antigeny byly po 100 μ l napipetovány na mikrotitrační destičku a ponechány inkubovat při 4°C přes noc. Následně byl vazebný roztok odstraněn a destička byla 3x promyta promývacím pufrem (PBS obsahující 0,05% Tween).

Pro zabránění případné nespecifické interakci bylo do každé jamky napipetováno 150 μ l blokovacího činidla (2% roztok BSA v TBS) a ponecháno inkubovat 1 hodinu při 37°C. Blokovací roztok byl poté odstraněn a destička byla opět 3x promyta promývacím pufrem.

b) Aplikace primární protilátky

Na destičku byly v paralelním provedení po 100 μ l nanесeny následující primární protilátky:

- nepurifikované slepičí protilátky IgY (označené „21“) o koncentraci 90 μ g/ml (21₉₀) a 9 μ g/ml (21₉)
- protilátka IgY purifikovaná pomocí afinitní chromatografie na imobilizovaném α -kaseinu po eluci 0,05 M diethylaminem o koncentraci 90 μ g/ml a 9 μ g/ml (E₉₀, E₉)
- kontrola (pre-imunní protilátka) o koncentraci 90 μ g/ml a 9 μ g/ml (K₉₀, K₉)

Po 2 hod. inkubace při 37°C byly protilátky odstraněny a destička byla 3 x promyta promývacím pufrem.

c) Aplikace sekundární protilátky a vyvolávací reakce

Pro ELISA testy byl použit roztok sekundární králičí protilátky proti slepičí protilátce označená RACHi (1 mg/ml; Px/IgY = 2,4). Sekundární protilátka byla značena křenovou peroxidázou. Do každé jamky mikrotitrační destičky byl napipetován ředěný roztok sekundární protilátky (100 μ l; ředění 1:1000 v TBS) a mikrotitrační destička byla inkubována 1 hod při 37°C. Nezachycená sekundární protilátka byla odstraněna a destička promyta 5x promývacím pufrem.

Druhým substrátem pro křenovou peroxidázu, vedle peroxidu vodíku, je 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonát), jehož produkt, v případě pozitivní reakce, poskytuje zelené zabarvení roztoku. Do 0,05 M citrátového pufru o pH 5,0 (10 ml) byl přidán substrát pro křenovou peroxidázu 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonát) (1 mg) a 30% peroxid vodíku (5 μ l). Tento roztok (100 μ l) byl napipetován do každé jamky a destička byla inkubována 10 min. Reakce byla poté zastavena přidáním 1% SDS (100 μ l). Absorbance byla změřena na spektrometru při vlnové délce 405 nm.

3.4.3 SDS-PAGE elektroforéza

Roztoky:

pufr A: 0,375 M Tris/HCl + 1 ml 10% SDS doplnit do 100 ml destilovanou vodou

polymerační roztok A: 30% akrylamid + 0,8% BIS rozpustit v pufru A

elektrodový pufr: 0,025 M Tris, 0,192 M glycin, 0,1% SDS

vzorkový pufr pH 6,8: 0,126 M Tris, 4% SDS, 20% glycerol, 10% merkaptoethanol, bromfenolová modř

barvicí roztok: 0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 46% (v/v) ethanol, 9,2% (v/v) kyselina octová

odbarvovací roztok: kyselina octová, ethanol a destilovaná voda v poměru 10:25:65

10% Separační gel:

| | |
|------------|-------------------------|
| 3,6 ml | pufru A |
| 2,4 ml | polymeračního roztoku A |
| 5 μ l | TEMED |
| 60 μ l | 10% persíran sodný |

5% Zaostrovací gel:

| | |
|-------------|-----------------------------|
| 250 μ l | 1M Tris/HCl, pH 6,8 |
| 330 μ l | 30% akrylamid obs. 0,8% bis |
| 20 μ l | 10% SDS |
| 2 μ l | TEMED |
| 20 μ l | 10% persíran sodný |
| 1,4 ml | destilovaná voda |

Vzorky:

- nepurifikované slepičí protilátky IgY (označené „21“) o koncentraci 1 mg/ml
- protilátka IgY purifikovaná pomocí afinitní chromatografie na imobilizovaném α -kaseinu po eluci 0,05 M diethylaminem o koncentraci 1 mg/ml a 3,5 mg/ml
- frakce protilátek, které se na imobilizovaný α -kasein neadsorbovaly, o koncentraci 1 mg/ml
- frakce protilátek po promytí afinitního nosiče 1M NaCl o koncentraci 2 mg/ml
- α -kasein o koncentraci 1 mg/ml
- Standard: Dual Color Precision Plus Protein Standards

Vzorky odebrané v průběhu jednotlivých kroků purifikace protilátek byly analyzovány pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Elektroforéza byla provedena v aparatuře Mini-PROTEAN III. Mezi skla sestavené aparatury byl nalit 10% separační gel, přibližně do 2/3 výšky. Separační gel byl převrstven propanolem. Po zpolymerování separačního

gelu byl propanol odlit. Na separační gel byl nalit roztok pro 5% zaostřovací gel, do kterého byl vnořen hřeben na vzorkové komůrky. Vzorky byly před nanesením na gel smíchány se vzorkovým pufrem v poměru 3:1 (v/v) a denaturovány pětiminutovým varem ve vodní lázni a ponechány deset minut zchladnout. Takto připravené vzorky (40 μ l) a standard (5 μ l) byly nanесeny do komůrek v zaostřovacím gelu.

Separace proteinů probíhala při konstantním napětí 150 V přibližně 90 min. Detekce proteinů byla provedena barvením Coomassie Brilliant Blue R-250.

3.4.3.1 Identifikace proteinů separovaných SDS-PAGE elektroforézou

Roztoky:

- 50% ACN v 0,025 M NH_4HCO_3
- 0,05 M TCEP (tris(2-karboxyethyl)fosfin) v 0,025 M NH_4HCO_3
- 0,1 M IAA v 0,025 M NH_4HCO_3
- trypsin v 0,025 M NH_4HCO_3 (10 ng/ μ l)
- 0,025 M NH_4HCO_3

Postup:

a) vyříznutí proteinových zón

Proužky proteinů, určené k MALDI-TOF MS analýze, byly z obarveného gelu vyříznuty skalpelem a nařezány na 1x1 mm až 2x2 mm kousky, které byly přemístěny do 200 μ l zkumavek.

b) odbarvení vzorků

Ke každému vzorku bylo přidáno 100 μ l 50% ACN v 25 mM NH_4HCO_3 . Vzorky byly třepány 15 min, poté centrifugovány a nakonec byl odbarvovací roztok odstraněn. Tyto kroky byly opakovány tak dlouho, dokud se všechny kousky gelu neodbarvily. Po úplném odbarvení byly vzorky 15 min vysušovány na vakuové odparce a skladovány při -20 °C.

c) redukce a alkylace

Následující kroky podle uvedeného postupu provedla Mgr. Lenka Novotná, Ph.D. Ke každému vzorku bylo přidáno 30 μ l roztoku TCEP a vzorky byly inkubovány 10 min při 60 °C. Po zchladnutí byly vzorky centrifugovány a roztok TCEP byl odstraněn. Ke vzorkům bylo přidáno 30 μ l roztoku IAA a vzorky byly inkubovány 1 hod ve tmě, poté centrifugovány a nakonec byl roztok IAA odstraněn. Ke každému vzorku bylo přidáno

100 μ l 50% ACN v 25mM NH_4HCO_3 a vzorky byly třepány 15 min, poté centrifugovány a roztok byl odstraněn. Poslední krok (přidání 50% ACN v 25mM NH_4HCO_3 , centrifugace a odstranění roztoku) byl opakován čtyřikrát.

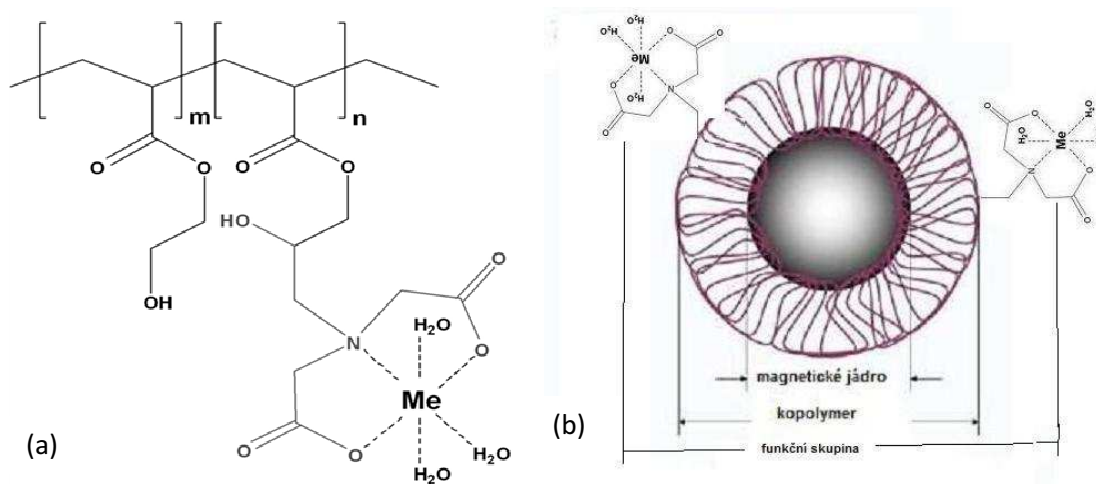
d) proteolytické štěpení proteinů

Ke každému vzorku bylo přidáno 50 μ l ACN a vzorky byly inkubovány 15 min při pokojové teplotě. ACN byl opatrně odstraněn a vzorky byly ponechány vyschnout 15 min na vzduchu. Ke vzorkům bylo přidáno 10 μ l roztoku trypsinu a vzorky byly inkubovány 15 min při laboratorní teplotě. Ke vzorkům byl poté přidán 25 mM NH_4HCO_3 tak, aby byly kousky gelu zcela převrstveny roztokem, a vzorky byly inkubovány přes noc při 37 °C za stálého míchání. Vzorky byly poté 15 min sonikovány v ultrazvukové lázni. Z každého vzorku bylo 2 x 0,5 μ l napipetováno na MALDI terčík a použito k MALDI-TOF MS/MS analýze. Ke zbytku vzorků bylo přidáno 0,2 μ l koncentrované TFA a vzorky byly 15 min sonikovány v ultrazvukové lázni. Peptidy byly následně purifikovány z okyselené reakční směsi na špičkách s C18 fází (postup viz kapitola 3.3.2) a podrobeny MALDI-TOF MS/MS analýze.

4. VÝSLEDKY

4.1 Použití P(HEMA-co-GMA) magnetických částic jako sorbentu pro IMAC separaci fosfopeptidů

Cílem této části práce bylo aplikovat neporézní hydrofilní poly(2-hydroxyethyl metakrylát-co-glycidyl metakrylátové) magnetické částice P(HEMA-co-GMA) modifikované iminodiotovou kyselinou s imobilizovanými Fe(III) nebo Ga(III) ionty (obr. 4.1a) k separaci fosfopeptidů z proteolytických směsí modelových fosfoproteinů. Magnetické částice byly připraveny disperzní kopolymerací 2-hydroxyethylmetakrylátu (HEMA) s glycidyl metakrylátem (GMA) v přítomnosti koloidních oxidů železa. Magnetické částice P(HEMA-co-GMA) modifikované iminodiotovou kyselinou byly připraveny na Ústavu makromolekulární chemie, Akademie věd České republiky Dr. D. Horákem a byly použity pro separaci prasečího pepsinu A (s imobilizovanými Fe(III) ionty) a adsorpci lidských imunoglobulinů (s imobilizovanými Ni(II) ionty) [47].



Obr. 4.1: a) P(HEMA-co-GMA) - poly(2-hydroxyethyl methakrylát-co-glycidyl methakrylát) + iminodiotová kyselina (IDA) + kovové ionty (Me) [47] b) model magnetického sorbentu

Na obr. 4.1b je ukázán model použitých magnetických částic. Magnetické částice jsou tvořeny třemi vrstvami (viz obr. 4.1b): vnitřní vrstvu tvoří magnetické jádro, střední

vrstvu tvoří uvedený kopolymer a ve vnější vrstvě se nachází funkční skupiny skládající se z iminodiotové kyseliny a Fe(III) nebo Ga(III) iontů. Fosfopeptidy jsou ze vzorku separovány díky specifické interakci mezi Fe(III) nebo Ga(III) ionty imobilizovanými na magnetických částicích a fosfátovou skupinou fosfopeptidů.

4.2 Separace fosfopeptidů z proteolytických směsí peptidů α -kaseinu a prasečího pepsinu A pomocí připravených magnetických sorbentů

Byly použity dva modelové proteiny lišící se svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi a obsahem fosfátových skupin – hovězí α -kasein a prasečí pepsin A. Hovězí α -kasein je mnohonásobně fosforylovaný protein, jehož všechny fosfátové skupiny jsou vázány na serinové zbytky. α -Kasein je směsí dvou forem (S1 formy a S2 formy), obsahuje relativně vysoký podíl prolinu a hydrofobních aminokyselin [49, 50]. Po štěpení α -kaseinu trypsinem lze nalézt v proteolytické směsi peptidů fosfopeptidy s jednou fosfátovou skupinou i vícenásobně fosforylované peptidy.

Prasečí pepsin A je představitelem kyselých proteinů, řadíme ho mezi aspartátové proteázy. Ve své molekule obsahuje jednu fosfátovou skupinu vázanou na serinový zbytek [51, 52] a velké množství kyselých aminokyselin, izoelektrický bod prasečího pepsinu A je velmi nízký [53]. Vzhledem k nízkému obsahu bazických aminokyselinových zbytků, byl v případě prasečího pepsinu A použit k získání proteolytické směsi peptidů α -chymotrypsin.

Proteolytické směsi peptidů z α -kaseinu rozštěpeného trypsinem a prasečího pepsinu A rozštěpeného α -chymotrypsinem byly použity ke zhodnocení úspěšnosti separace fosfopeptidů na neporézních hydrofilních poly(2-hydroxyethyl metakrylát-*co*-glycidyl metakrylátových) magnetických částicích modifikovaných iminodiotovou kyselinou s navázanými Fe(III) nebo Ga(III) ionty.

4.2.1 Optimalizace podmínek pro adsorpci a eluci fosfopeptidů

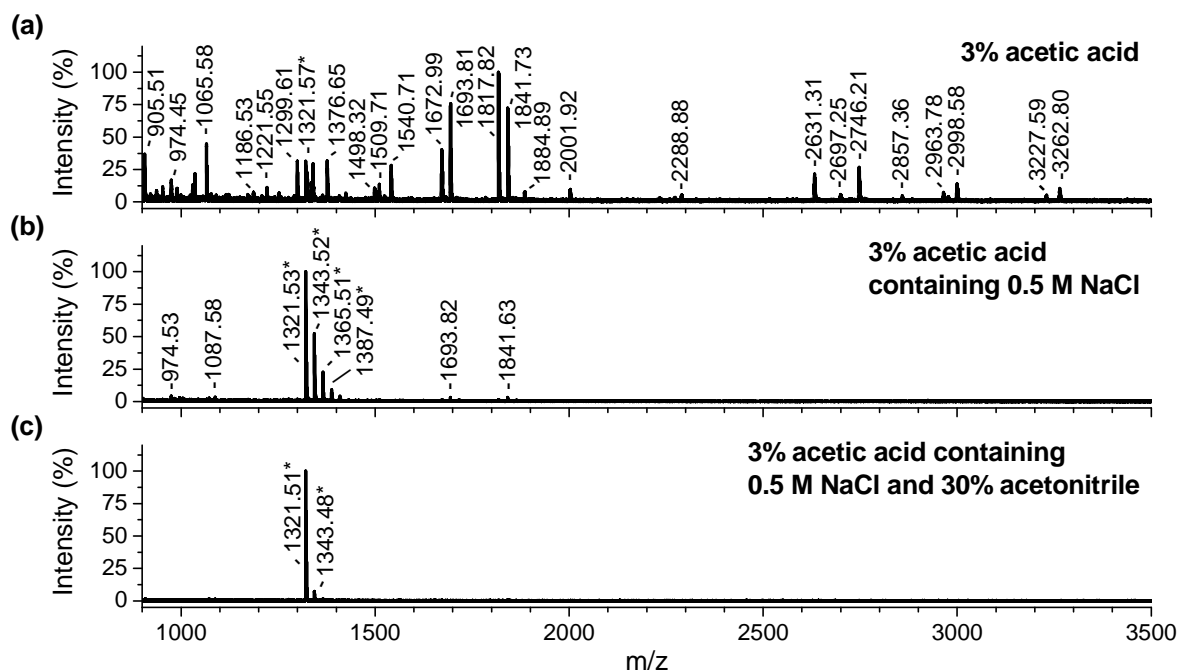
K nalezení nejvhodnějších adsorpčních podmínek byly testovány různé adsorpční pufrы: 0,1%; 0,5%; 3,0% a 6,0% kyselina octová obsahující NaCl (0; 0,1; 0,5 nebo 1 M) a acetonitril (0% nebo 30%). Dále 0,025 M acetátový pufr o pH 3,5; 4,0; 5,0 a 6,0 obsahují NaCl (0; 0,1; 0,5 nebo 1M) a acetonitril (0% nebo 30%), 0,025 M glycin-HCl pufr o pH 2,5; 3,0 a 3,5 obsahující NaCl (0; 0,1; 0,5 a 1 M) a acetonitril (0% nebo 30%). Snažili

jsme se nalézt takové adsorpční podmínky, kdy se na připravený magnetický sorbent adsorbuje co nejvíce fosforylovaných peptidů přítomných ve vzorku a zároveň co nejméně nefosforylovaných peptidů.

Množství separovaných fosfopeptidů lze ovlivnit vhodnou volbou pH adsorpčního pufru [28, 33, 36, 37, 38]. Na základě vztahu mezi hodnotou pH a znalostí hodnot pK_a kyseliny asparagové (3,65), kyseliny glutamové (4,25) a fosfátové skupiny (1,52) lze optimální pH očekávat mezi 2,5 až 3,0. Při tomto pH jsou téměř všechny fosfátové skupiny negativně nabitě a pouze malá část karboxylových skupin kyselých aminokyselin je negativně nabitá [36]. Námi nalezené optimální adsorpční podmínky (viz tab. 4.1) splňují tyto předpoklady: 6% kyselina octová má pH 2,5 a 3% kyselina octová má pH 2,7.

Kromě vhodného pH adsorpčního pufru ovlivňuje adsorpci peptidů také zvýšení iontové síly [33]. Zvýšení iontové síly adsorpčního pufru vede k zeslabení elektrostatických interakcí mezi peptidy a nabitými IMAC sorbenty. V důsledku zvýšení iontové síly adsorpčního pufru dojde ke snížení adsorpce těch peptidů, které interagují s IMAC sorbenty prostřednictvím elektrostatických interakcí. V přítomnosti 0,5M NaCl v adsorpčním pufru jsme obecně pozorovali menší sorpci nefosforylovaných peptidů na magnetický sorbent než v adsorpčním pufru, který sůl neobsahoval. Některé nefosforylované peptidy se tedy na IMAC sorbent váží pravděpodobně prostřednictvím elektrostatických interakcí. Vliv zvýšené iontové síly adsorpčního pufru na adsorpci fosforylovaných a nefosforylovaných peptidů z proteolytické směsi peptidů prasečího pepsinu A je ukázán na obr. 4.2b.

Kromě přídavku NaCl byl také testován přídavek acetonitrilu do adsorpčního pufru. Tyto experimenty nepřinesly žádné přesvědčivé výsledky. V některých podmínkách se podařilo přídavkem acetonitrilu do adsorpčního pufru dosáhnout menší sorpce nefosforylovaných peptidů, zatímco v některých podmínkách došlo po přidání acetonitrilu ke snížení počtu adsorbovaných fosfopeptidů. Vliv přídavku acetonitrilu do adsorpčního pufru na adsorpci fosforylovaných a nefosforylovaných peptidů z proteolytické směsi peptidů prasečího pepsinu A je ukázán na obr. 4.2c.



Obr. 4.2: MALDI-TOF MS analýza fosfopeptidů z proteolytické směsi peptidů prasečího pepsinu A separovaných na Fe(III)-IDA modifikovaném magnetickém sorbentu. Porovnání různých adsorpčních podmínek. a) adsorpce v 3% kyselině octové; b) adsorpce v 3% kyselině octové obsahující 0,5 M NaCl; c) adsorpce v 3% kyselině octové obsahující 0,5 M NaCl a 30 % ACN.

Bylo testováno několik elučních činidel. V případě fosfopeptidů lze eluci provádět zvýšením pH nebo přidavkem fosfátu (kompetitivní eluce) [28]. Jako eluční činidla byly použity: hydroxid amonný (5 mM), hydrogenfosforečnan amonný (0,2; 0,5 a 1M) a kyselina fosforečná (0,1%; 1,0% a 10 %) obsahující acetonitril (0 nebo 50%). Vhodné eluční činidlo uvolní co nejvíce fosfopeptidů zachycených na magnetický sorbent. Jako nejvhodnější eluční činidlo v případě připravených IMAC magnetických sorbentů byl zvolen 0,2 M hydrogenfosforečnan amonný.

Nalezené optimální podmínky adsorpce fosfopeptidů z obou proteolyticky štěpených modelových fosfoproteinů na magnetické sorbenty a eluce fosfopeptidů z magnetických sorbentů jsou shrnuty v tabulce 4.1.

Tabulka 4.1: Optimální podmínky pro separaci fosfopeptidů na připravených magnetických sorbentech.

| IMAC sorbent | vzorek | adsorpční podmínky | pH | eluční podmínky |
|----------------|---|-----------------------------|-----|----------------------------------|
| Fe(III)-IDA-MS | proteolytické štěpy α -kaseinu | 6% AA + 0,5M NaCl | 2,5 | 0,2 M hydrogenfosforečnan amonný |
| Fe(III)-IDA-MS | proteolytické štěpy prasečího pepsinu A | 3% AA + 0,5M NaCl + 30% ACN | 2,7 | 0,2 M hydrogenfosforečnan amonný |
| Ga(III)-IDA-MS | proteolytické štěpy α -kaseinu | 6% AA + 0,5M NaCl | 2,5 | 0,2 M hydrogenfosforečnan amonný |
| Ga(III)-IDA-MS | proteolytické štěpy prasečího pepsinu A | 6% AA + 0,5M NaCl + 30% ACN | 2,5 | 0,2 M hydrogenfosforečnan amonný |

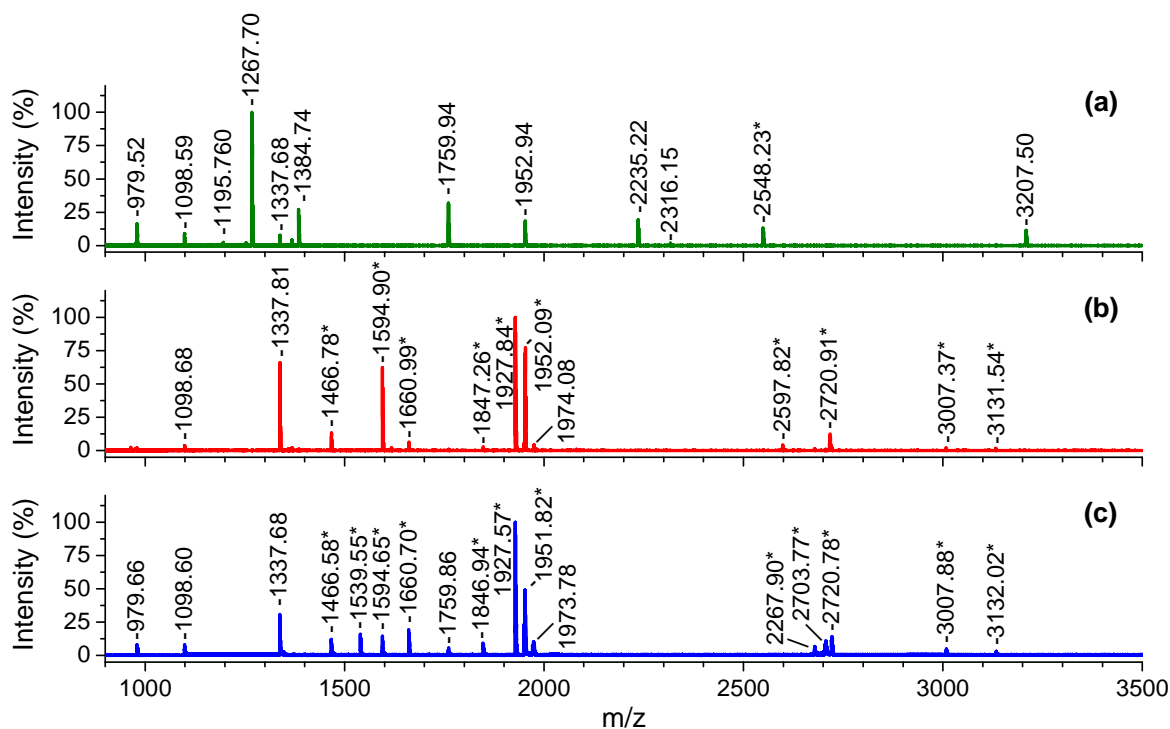
pozn.: MS – magnetický sorbent, AA- kyselina octová, ACN - acetonitril

4.3 MALDI-TOF MS analýza frakce fosfopeptidů separované z proteolyticky štěpených modelových fosfoproteinů

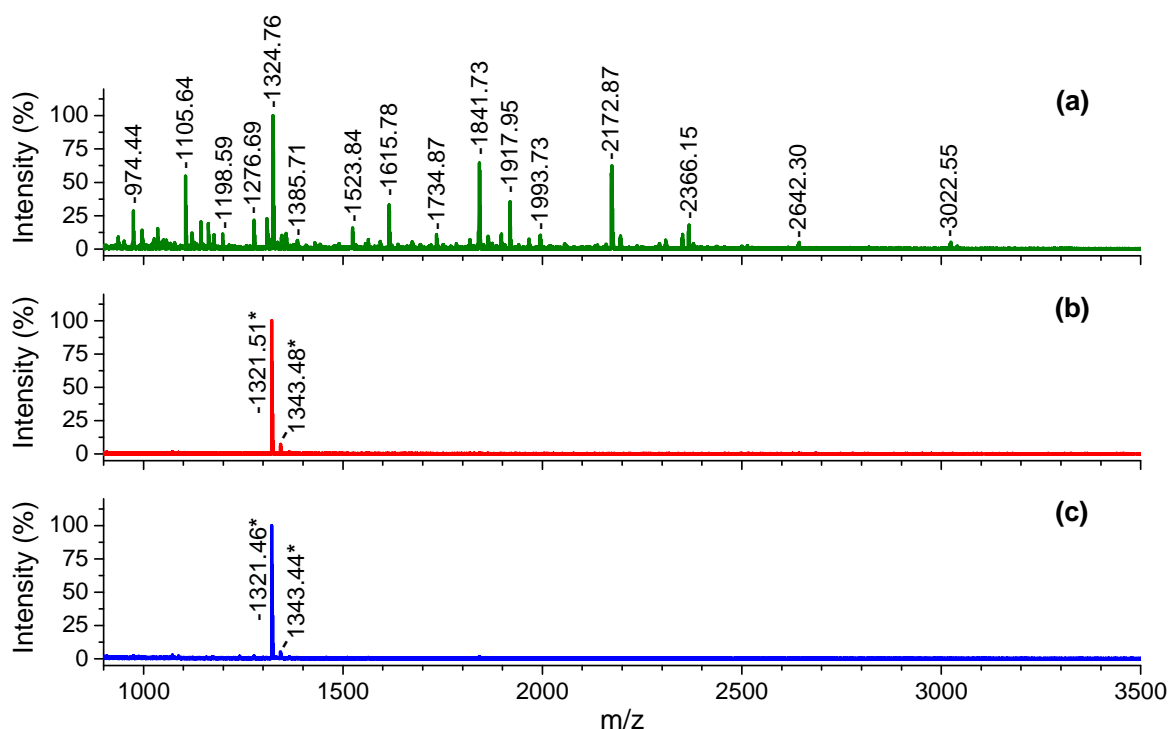
Detailní informace o způsobu identifikace fosfopeptidů jsou uvedeny v části 3.3.4.2.

V MALDI-TOF MS spektru směsi peptidů získané štěpením α -kaseinu trypsinem (obr. 4.3a) byl pozorován jediný fosfopeptid (m/z 2548) a 14 nefosforylovaných peptidů. V MALDI-TOF MS spektru směsi peptidů po štěpení prasečího pepsinu A α -chymotrypsinem (obr. 4.4a) nebyl identifikován žádný fosfopeptid a 37 nefosforylovaných peptidů. Přítomnost velkého počtu nefosforylovaných peptidů může vést k potlačení ionizace fosforylovaných peptidů. V důsledku toho jsou signály fosfopeptidů v MALDI-TOF MS spektrech původních vzorků (bez předchozí izolace fosfopeptidů) výrazně redukovány nebo nejsou přítomny.

Poté, co byla původní proteolytická směs peptidů nejprve podrobena separaci na Fe(III)-IDA modifikovaném magnetickém sorbentu nebo Ga(III)-IDA modifikovaném magnetickém sorbentu, je z hmotnostních spekter (obr. 4.3b, c a obr. 4.4b, c) patrné, že nefosforylované peptidy byly z větší části efektivně eliminovány a bylo identifikováno větší množství fosfopeptidů.



Obr. 4.3: MALDI-TOF MS analýza fosfopeptidů z proteolytické směsi peptidů α -kaseinu. Fosforylované peptidy jsou označeny hvězdičkou. a) neseparovaná směs peptidů získaná štěpením α -kaseinu trypsinem b) směs peptidů α -kaseinu po separaci na Fe(III)-IDA modifikovaném magnetickém sorbentu c) směs peptidů α -kaseinu po separaci na Ga(III)-IDA modifikovaném magnetickém sorbentu; podmínky separace fosfopeptidové frakce: adsorpce – 6% kyselina octová obsahující 0,5 M NaCl; eluce – 0,2 M hydrogenfosforečnan amonný.



Obr. 4.4: MALDI-TOF MS analýza fosfopeptidů z proteolytické směsi peptidů prasečího pepsinu A. Fosforylované peptidy jsou označeny hvězdičkou. a) neseparovaná směs peptidů získaná štěpením prasečího pepsinu A α -chymotrypsinem b) směs fosfopeptidů prasečího pepsinu A po separaci na Fe(III)-IDA modifikovaném magnetickém sorbentu c) směs fosfopeptidů prasečího pepsinu A po separaci na Ga(III)-IDA modifikovaném magnetickém sorbentu; podmínky separace fosfopeptidové frakce: adsorpce – 3% kyselina octová obsahující 0,5 M NaCl a 30% acetonitril (imobilizované Fe(III) ionty) nebo 3% kyselina octová obsahující 0,5 M NaCl a 30% acetonitril (imobilizované Ga(III) ionty); eluce – 0,2 M hydrogenfosforečnan amonný.

4.3.1 Separace fosfopeptidů z proteolytické směsi peptidů α -kaseinu

Směs peptidů získaná štěpením α -kaseinu trypsinem byla nejprve separována pomocí IMAC na magnetickém sorbentu za podmínek uvedených v Tab. 4.1 a poté analyzována pomocí MALDI-TOF MS (obr. 4.3b a 4.3c). Ve spektru bylo nalezeno 10 fosfopeptidů a 2 nefosforylované peptidy v případě Fe(III)-IDA modifikovaného magnetického sorbentu (tab. 4.2) a 12 fosfopeptidů a 4 nefosforylované peptidy při užití Ga(III)-IDA modifikovaného magnetického sorbentu (tab. 4.3). Navíc část fosfopeptidů obsahovala více fosforylačních míst: byl nalezen jeden pětínásobně fosforylovaný peptid, jeden čtyřnásobně fosforylovaný peptid, dva trojnásobně fosforylované peptidy, tři dvojnásobně fosforylované peptidy a šest fosfopeptidů s jednou fosfátovou skupinou. Tyto výsledky dokazují, že jak fosfopeptidy s jednou fosfátovou skupinou tak i vícenásobně fosforylované fosfopeptidy lze úspěšně detekovat MALDI-TOF MS po předchozím obohacení fosfopeptidů IMAC metodou na polymerních metakrylátových magnetických částicích modifikovaný iminodioctovou kyselinou s navázanými Fe(III) nebo Ga(III) ionty.

Tabulka 4.2: Peptidy separované z proteolytické směsi α -kaseinu na Fe(III)-IDA modifikovaném magnetickém sorbentu.

| m/z | řetězec | sekvence peptidu | počet fosforylačních míst |
|---------|-----------------------------|------------------------------------|---------------------------|
| 1098,68 | α -S2-kasein/204-212 | AMKPWIQPK | 0 |
| 1337,81 | α -S1-kasein/95-105 | HIQKEDVPSEK | 0 |
| 1466,78 | α -S2-kasein/153-164 | TVDMEpSTEVFTK | 1 |
| 1594,90 | α -S2-kasein/153-165 | TVDMEpSTEVFTKK | 1 |
| 1660,99 | α -S1-kasein/121-134 | VPQLEIVPNpSAEER | 1 |
| 1847,26 | α -S1-kasein/58-73 | DIGSEpSTEDQAMEDIK | 1 |
| 1927,84 | α -S1-kasein/58-73 | DIGpSEpSTEDQAMEDIK | 2 |
| 1952,21 | α -S1-kasein/119-134 | YKVPQLEIVPNpSAEER | 1 |
| 1974,08 | neidentifikováno | | |
| 2597,82 | α -S1-kasein/52-73 | VNELpSKDIGSEpSTEDQAMEDIK | 2 |
| 2720,91 | α -S1-kasein/74-94 | QMEAEpSlpSpSpSEEIVPNpSVEQK | 5 |
| 3007,37 | α -S2-kasein/61-85 | NANEEEEYSIGpSpSpSEEpSAEVA TEEVK | 4 |
| 3131,54 | α -S2-kasein/141-165 | EQLpSTpSEENSKKTVDMEpSTE VFTKK | 3 |

Pozn.: Naměřené hodnoty m/z peptidových iontů byly porovnány s teoretickými hodnotami získanými *in silico* štěpením α -kaseinu trypsinem (kapitola 3.3.4.2.). Sekvence takto identifikovaných peptidů byly ověřeny MS/MS analýzou.; pS – fosfoserin

Tabulka 4.3: Peptidy separované z proteolytické směsi α -kaseinu na Ga(III)-IDA modifikovaném magnetickém sorbentu.

| m/z | řetězec | sekvence peptidu | počet fosforylačních míst |
|---------|-----------------------------|------------------------------|---------------------------|
| 979,66 | α -S2-kasein/189-196 | FALPQYLK | 0 |
| 1098,60 | α -S2-kasein/204-212 | AMKPWIQPK | 0 |
| 1337,68 | α -S1-kasein/95-105 | HIQKEDVPSEK | 0 |
| 1466,58 | α -S2-kasein/153-164 | TVDMEpSTEVFTK | 1 |
| 1539,55 | α -S2-kasein/141-152 | EQLpSTpSEENSKK | 2 |
| 1594,65 | α -S2-kasein/153-165 | TVDMEpSTEVFTKK | 1 |
| 1660,70 | α -S1-kasein/121-134 | VPQLEIVPNpSAEER | 1 |
| 1759,86 | α -S1-kasein/23-37 | HQGLPQEVLENLLR | 0 |
| 1846,94 | α -S1-kasein/58-73 | DIGSEpSTEDQAMEDIK | 1 |
| 1927,57 | α -S1-kasein/58-73 | DIGpSEpSTEDQAMEDIK | 2 |
| 1951,82 | α -S1-kasein/119-134 | YKVPQLEIVPNpSAEER | 1 |
| 1973,78 | neidentifikováno | - | - |
| 2677,90 | α -S1-kasein/52-73 | VNELpSKDIGpSEpSTEDQAMEDIK | 3 |
| 2703,77 | α -S1-kasein/114-135 | LRLKKYKVPQLEIVPNpSAEERL | 1 |
| 2721,1 | α -S1-kasein/74-94 | QMEAEpSIpSpSpSEEIVPNpSVEQK | 5 |
| 3007,88 | α -S2-kasein/61-85 | NANEEYSIGpSpSpSEEpSAEVATEEVK | 4 |
| 3132,02 | α -S2-kasein/141-165 | EQLpSTpSEENSKKTVDMEpSTEVFTKK | 3 |

Pozn.: Naměřené hodnoty m/z peptidových iontů byly porovnány s teoretickými hodnotami získanými *in silico* štěpením α -kaseinu trypsinem (kapitola 3.3.4.2). Sekvence takto identifikovaných peptidů byly ověřeny MS/MS analýzou.; pS – fosfoserin

4.3.2 Separace fosfopeptidů z proteolytické směsi peptidů prasečího pepsinu A

V proteolytické směsi prasečího pepsinu A byly v MALDI-TOF MS spektru (obr. 4.4b a 4.4c), po předchozí IMAC separaci na magnetickém sorbentu za podmínek uvedených v Tab. 4.1, nalezeny dva fosforylované peptidy a žádný nefosforylovaný peptid při použití jak Fe(III)-IDA tak i Ga(III)-IDA modifikovaného magnetického sorbentu. V MALDI-TOF MS spektrech (obr. 4.4b a 4.4c) byl identifikován dominantní fosfopeptidový ion o m/z 1321,51 a druhý fosforylovaný ion o m/z 1343,48. V tomto případě se podařilo izolovat jediný fosfopeptid přítomný ve vzorku a nebyly detekovány žádné nefosforylované peptidy. Peptidy identifikované z proteolytické směsi peptidů prasečího pepsinu A po IMAC separaci na metakrylátových magnetických částicích modifikovaných iminodioxetovou kyselinou s navázanými Fe(III) nebo Ga(III) ionty jsou shrnuty v tabulce 4.4.

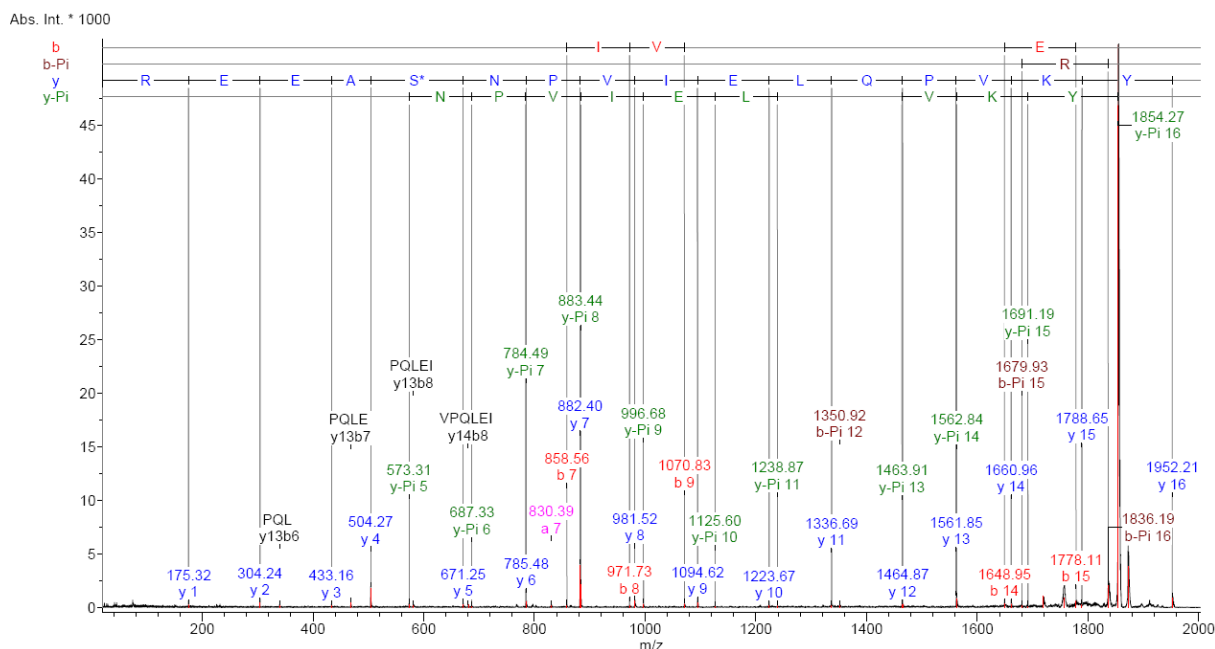
Tabulka 4.4: Peptidy separované z proteolytické směsi prasečího pepsinu A na Ga(III)-IDA a Fe(III) modifikovaném magnetickém sorbentu.

| m/z | řetězec | sekvence peptidu | počet fosforylačních míst |
|---------|----------------|--|---------------------------|
| 1321,51 | pepsin/124-134 | EATpSQELSITY | 1 |
| 1343,48 | pepsin/124-134 | EATpSQELSITY pozn. adukt se sodíkem | 1 |

Pozn.: Naměřené hodnoty m/z peptidových iontů byly porovnány s teoretickými hodnotami získanými *in silico* štěpením prasečího pepsinu A α -chymotrypsinem (kapitola 3.3.4.2.). Sekvence takto identifikovaných peptidů byly ověřeny MS/MS analýzou.; pS – fosfoserin

4.3.3 MALDI-TOF MS/MS analýza fosfopeptidů separovaných z proteolytických směsí peptidů α -kaseinu a prasečího pepsinu A

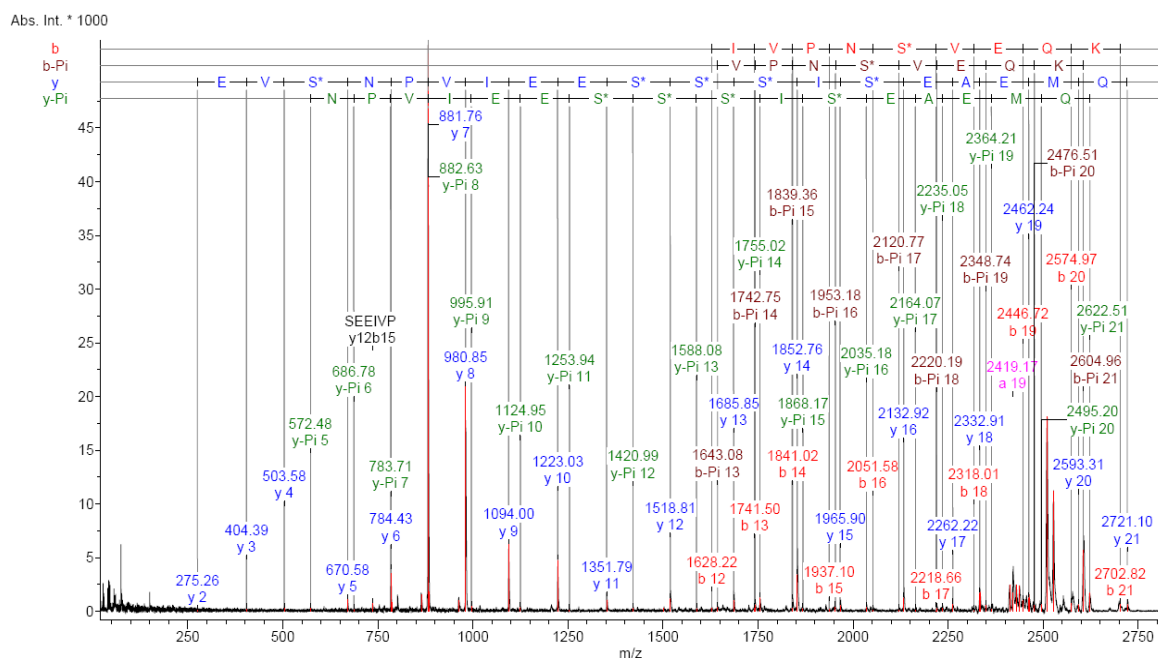
MALDI-TOF MS/MS analýza byla použita pro ověření sekvence a místa fosforylace fosfopeptidů separovaných z proteolytických směsí peptidů α -kaseinu a prasečího pepsinu A. Fosfopeptidy byly identifikovány pomocí programu mMass (podrobný postup viz kapitola 3.3.4.2) a nalezené sekvence fosfopeptidů byly ověřeny MS/MS analýzou. Byly ověřeny sekvence a místa fosforylace fosforylovaných peptidů z tabulek 4.2, 4.3 a 4.4. Jako příklad je v MALDI-TOF MS/MS spektru na obr. 4.5 uveden fosfopeptid získaný z proteolytické směsi peptidů α -kaseinu s jednou fosfátovou skupinou sekvence YKVPQLEIVNP \mathbf{p} SAEER o m/z 1952,21 a fosfopeptid s pěti fosfátovými skupinami o sekvenci QMEAEpSIpSpSpSEEIVNP \mathbf{p} SVEQK a m/z 2721,1 (obr. 4.6).



Obr. 4.5: MALDI-TOF MS/MS spektrum rodičovského iontu m/z 1952,21.

(fosfopeptid získaný z proteolytické směsi peptidů α -kaseinu)

Pokrytí aminokyselinové sekvence je ukázáno b, b-Pi, y, y-Pi fragmentovými ionty. Ztráta 97,94 Da (m/z 1854,27) ukazuje na monofosforylaci rodičovského iontu. Rozdíl hmotností 166,98 Da mezi fragmentovými ionty y5 (m/z 671,25) a y4 (m/z 504,27) odpovídá fosfoserinovému zbytku; to indikuje fosforylaci na serinovém zbytku.



Obr. 4.6: MALDI-TOF MS/MS spektrum rodičovského iontu m/z 2721,10 (fosfopeptid získaný z proteolytické směsi peptidů α -kaseinu)

Pokrytí aminokyselinové sekvence je ukázáno b, b-Pi, y, y-Pi fragmentovými ionty. Rozdíly hmotností ~ 167 Da mezi fragmentovými ionty y16 (m/z 2132,92) a y15 (m/z 1965,90), fragmentovými ionty y14 (m/z 1852,76) a y13 (m/z 1685,85), fragmentovými ionty y13 (m/z 1685,85) a y12 (m/z 1518,81), fragmentovými ionty y12 (m/z 1518,81) a y11 (m/z 1351,79) a fragmentovými ionty y5 (m/z 670,58) a y4 (m/z 503,58) odpovídají fosfoserinovým zbytkům. To indikuje fosforylaci na všech pěti serinových zbytcích.

4.4 Purifikace slepičích protilátek proti proteinům fosforylovaných na serinových zbytcích pomocí afinitní chromatografie na Sepharose s imobilizovaným α -kaseinem

Cílem této části diplomové práce bylo vyzkoušet možnost použití slepičích protilátek po imobilizaci na připravený magnetický sorbent pro studium fosforylace proteinů. Připravené protilátky byly nejdříve afinitně separovány.

4.4.1 Imobilizace α -kaseinu na CNBr-aktivovanou Sepharosu

Na CNBr-aktivovanou Sepharosu 4B byl imobilizován α -kasein podle postupu doporučeným výrobcem. Sloupec Sepharosy s imobilizovaným α -kaseinem o objemu 3 ml byl před použitím promyt po 100 ml následujících roztoků: destilovanou vodou, 0,15M NaCl, 1M NaCl, 0,05M diethylaminem a na závěr 0,15M NaCl.

4.4.2 Afinitní purifikace protilátek IgY na Sepharose s imobilizovaným α -kaseinem

Proteinová frakce získaná z vaječných žloutků po imunizaci slepic pomocí KLH s navázaným O-fosforyl-L-serinem byla připravena ve firmě Hena s.r.o.

Protilátky IgY byly izolovány afinitní chromatografií na sloupci Sepharosy s imobilizovaným α -kaseinem. Frakce protilátek, která se na sloupec Sepharosy s imobilizovaným α -kaseinem nenavázala, byla uchována. Z absorbance při 280 nm byla stanovena přibližná koncentrace proteinů v této nenavázané frakci označené „NPV“: $c(\text{NPV}) = 20,1 \text{ mg/ml}$.

Po odstranění nenavázané frakce („NPV“) byla kolonka promyta 30 ml TBS. Dále byla kolonka promyta 0,05M Tris/HCl obsahující 1M NaCl. Frakce vytékající z kolonky byly jímány po 1,5 ml do zkumavek. V každé frakci byla proměřena absorbance při 280 nm a kolonka byla promývána tak dlouho, dokud hodnota absorbance neklesla téměř k 0. Naměřené absorbance při 280 nm při promývání afinitního nosiče 1M NaCl jsou zaznamenány v tabulce 4.5.

Tabulka 4.5: Absorbance při 280 nm měřená při promýváním afinitního nosiče 1M NaCl.

| č. frakce | V _{celk.} (1M NaCl) [ml] | A ₂₈₀ |
|-----------|-----------------------------------|------------------|
| 1 | 1,5 | 0,2474 |
| 2 | 3,0 | 0,0812 |
| 3 | 4,5 | 0,0638 |
| 4 | 6,0 | 0,0341 |
| 5 | 7,5 | 0,0224 |

První dvě frakce s nejvyšší absorbancí při 280 nm ($A_{1280} = 0,2474$ a $A_{2280} = 0,0812$) byly spojeny a dialyzovány proti 10 l TBS obsahující 0,1% azid sodný.

K eluci specificky adsorbovaných protilátek IgY byl použit 0,05M diethylamin o pH 11,5. Bylo získáno celkem 8 elučních frakcí po 1 ml. V každé eluční frakci bylo proměřeno UV spektrum v rozmezí 200 až 400 nm. Frakce vykazující nejvyšší hodnotu absorbance při 280 nm (frakce č. 3 a 4) byly spojeny a dialyzovány proti 10 l TBS obsahují 0,1% azid sodný.

4.5 Charakterizace protilátek IgY purifikovaných afinitní chromatografií na imobilizovaném α -kaseinu

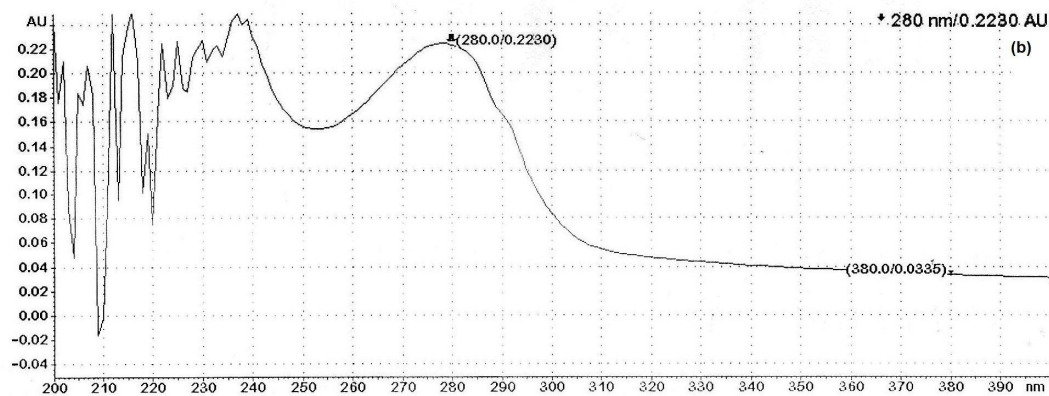
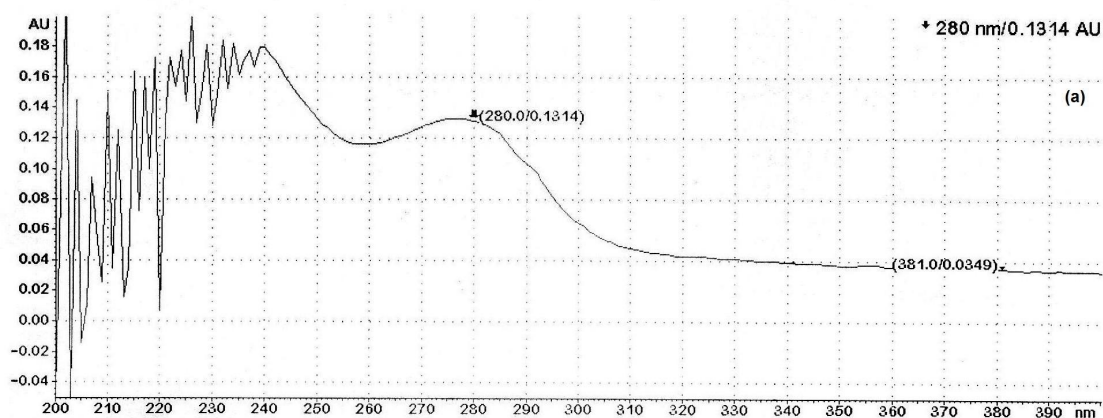
Frakce protilátek IgY získané v průběhu afinitní purifikace na imobilizovaném α -kaseinu byly charakterizovány:

- proměřením UV spekter v oblasti 200-400 nm
- ELISA testem
- SDS-PAGE elektroforézou

4.5.1 UV spektra v oblasti 200-400 nm

Ve frakcích získaných během afinitní purifikace na Sepharose s imobilizovaným α -kaseinem byla proměřena UV spektra v oblasti 200-400 nm. Na obr. 4.7a a 4.7b jsou zobrazena UV spektra v oblasti 200-400 nm získaná proměřením dialyzovaných frakcí:

- protilátek po promytí afinitního nosiče 1M NaCl označené „P_{NaCl}“
- purifikovaných protilátek po eluci 0,05M diethylaminem označené „E“



Obr. 4.7: UV spektra v oblasti 200-400 nm.

a) frakce protilátek po promytí afinitního nosiče 1M NaCl; b) frakce protilátek po eluci 0,05M diethylaminem

Z naměřených UV spekter byla odečtena absorbance při 280 nm (od hodnoty absorbance při 280 nm byla nejdříve odečtena hodnota absorbance při 380 nm) a stanovena přibližná koncentrace proteinů. V tabulce 4.6 jsou shrnuty vypočítané koncentrace

proteinů a celkové objemy frakcí získaných v průběhu afinitní purifikace protilátek na Sepharose s imobilizovaným α -kaseinem.

Tabulka 4.6: Koncentrace proteinů a celkový objem frakcí získaných v průběhu afinitní purifikace protilátek IgY.

| frakce | koncentrace proteinu [mg/ ml] | celkový objem frakce [ml] |
|----------------------|-------------------------------|---------------------------|
| „P _{NaCl} “ | 0,20 | 3,5 |
| „E“ | 0,35 | 3,0 |

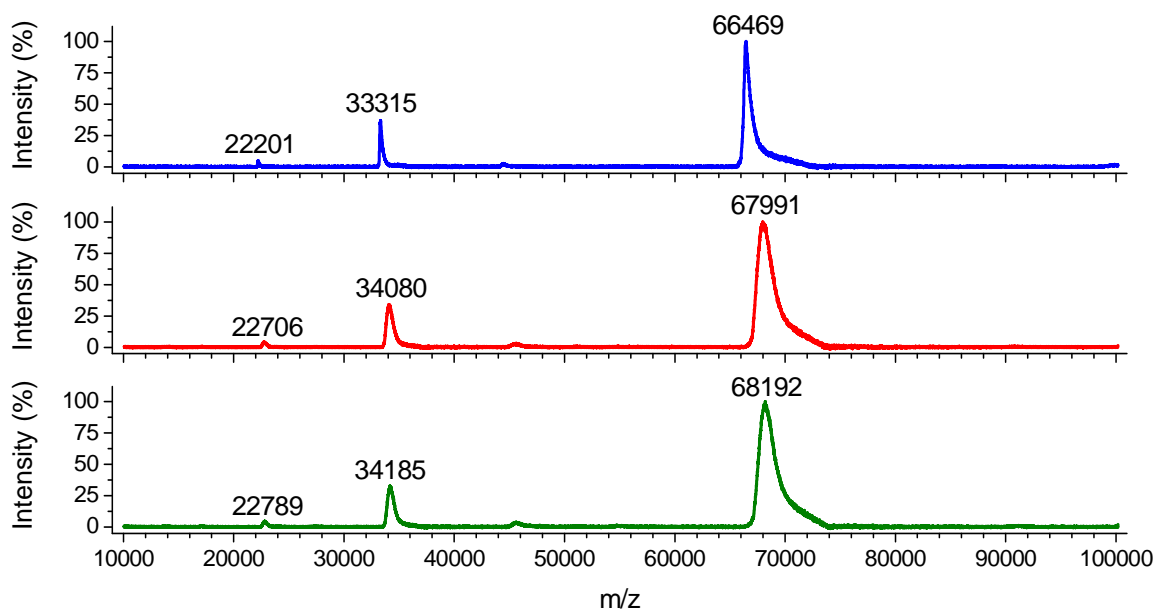
„P_{NaCl}“ – frakce protilátek po promytí afinitního nosiče 1M NaCl

„E“ – frakce protilátek IgY po eluci 0,05M diethylaminem:

4.5.2 ELISA test – zhodnocení specifity připravených protilátek IgY

4.5.2.1 Příprava syntetického antigenu pro ELISU protilátek

Pro vazbu O-fosforyl-L-serinu na BSA byla zvolena karbodiimidová reakce. V prvním kroku byl BSA modifikován maleinanhydridem za vzniku maleylovaného BSA (MA-BSA). Ve druhém kroku byl O-fosforyl-L-serin navázán přes svojí NH₂ skupinu na volné karboxylové skupiny maleylovaného BSA za vzniku maleylovaného BSA s navázaným O-fosforyl-L-serinem (p-Ser-MA-BSA). Přítomnost navázaného ligandu na BSA byla analyzována MALDI-TOF MS analýzou (Obr. 4.8).

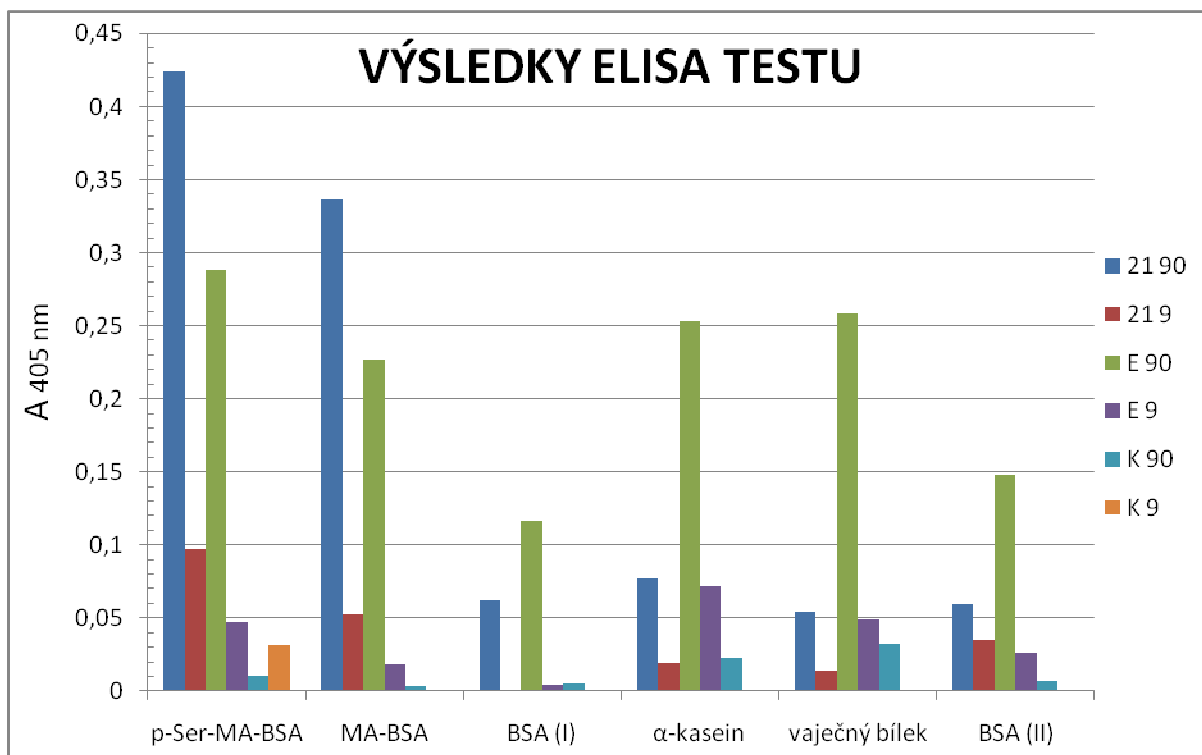


Obr. 4.8: MALDI-TOF MS analýza sledující úspěšnost vázání O-fosforyl-L-serinu na BSA. BSA (modře); maleylovaný BSA - MA-BSA (červeně); maleylovaný BSA s navázaným O-fosforyl-L-serinem- p-Ser-MA-BSA (zeleně)

Z MALDI-TOF MS spekter na obr. 4.8 je patrné, že navázání každé další složky na molekulu BSA (maleyl a poté O-fosforyl-L-serin) vykazuje posun m/z , z toho usuzujeme, že se jednotlivé složky na BSA skutečně navázaly.

4.5.2.2 ELISA test

Specifita protilátek IgY byla testována pomocí ELISA testu. Jako antigeny byly použity přirozené fosfoproteiny: α -kasein a ovalbumin přítomný ve vaječném bílku a také připravený syntetický antigen maleylovaný BSA s navázaným O-fosforyl-L-Serinem (p-Ser-MA-BSA). Jako kontrolní antigeny byly použity: maleylovaný BSA (MA-BSA) a BSA(I) a BSA(II). BSA (I) – použitý při přípravě syntetických antigenů p-Ser-MA-BSA a MA-BSA, BSA (II) – používáný při blokování. Na uvedených antigenech byla testována a porovnána odpověď tří preparátů protilátek: nepurifikované protilátky IgY označené „21“, afinitně purifikované protilátky IgY označené „E“ a kontrolní protilátky (pre-imunní protilátka) IgY označené „K“. Výsledky ELISA testu jsou uvedeny na obr. 4.9.



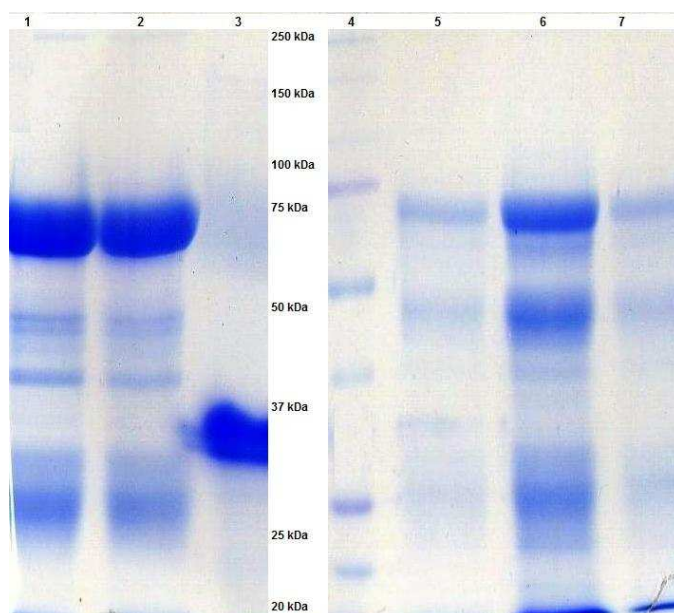
Obr. 4.9: Výsledky ELISA testu specifity protilátek IgY.

Antigeny: maleylovaný BSA s navázaným O-fosforyl-L-Serinem (p-Ser-MA-BSA), maleylovaný BSA (MA-BSA), BSA (I), α -kasein, vaječný bílek, BSA (II). Odpověď byla testována u tří preparátů protilátek IgY: nepurifikované slepičí protilátky IgY označené „21“: koncentrace 90 $\mu\text{g/ml}$ (21₉₀) a 9 $\mu\text{g/ml}$ (21₉); afinitně purifikovaná protilátky IgY označené „E“: koncentrace 90 $\mu\text{g/ml}$ a 9 $\mu\text{g/ml}$ (E₉₀, E₉); kontrolní protilátky označené „K“ (pre-imunní protilátka) o koncentraci 90 $\mu\text{g/ml}$, 9 $\mu\text{g/ml}$ (K₉₀, K₉).

Výsledky ELISA testu ukazují na nízkou specifitu připravených protilátek.

4.5.3 SDS-PAGE elektroforéza

SDS-PAGE elektroforézou byly analyzovány jednat frakce získané afinitní purifikací protilátek IgY na imobilizovaném α -kaseinu („P_{NaCl}“ a „E“), ale i původní nepurifikovaná protilátky IgY označená „21“ a frakce protilátek, která se na imobilizovaný α -kasein neadsorbovala označená „NPV“. Pro kontrolu byl analyzován α -kasein pro případ, že by se z nosiče uvolňoval při promývání imobilizovaný α -kasein. Výsledky SDS-PAGE elektroforézy jsou zobrazeny na obr. 4.10.



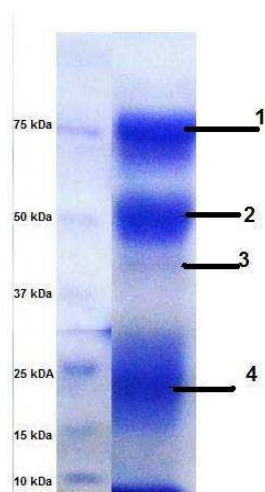
Obr. 4.10: 10% SDS-PAGE elektroforéza frakcí protilátek před afinitní purifikací a frakcí získaných v průběhu afinitní purifikace.

1 – frakce protilátky nenavázané na kolonu „NPV“, koncentrace: 1 mg / ml; 2 - nepurifikovaná protilátka „21“, koncentrace: 1 mg / ml; 3 – α -kasein, koncentrace: 1 mg/ ml; 4 – marker molekulových hmotností ; 5 – frakce protilátek po promytí 1M NaCl 10 x koncentrovaný vzorek, koncentrace: 2,0 mg/ ml; 6 - frakce protilátek po eluci 50 mM diethylaminem 10 x koncentrovaný vzorek, koncentrace: 3,5 mg/ ml; 7- frakce protilátek po eluci 50 mM diethylaminem, koncentrace: 1 mg / ml; Všechny vzorky byly naneseny po 40 μ l, marker molekulových hmotností 10 μ l.

Z výsledků SDS-PAGE elektroforézy na obr. 4.10 vyplývá, že ve frakci příslušející purifikovaným protilátkám (dráha 6 a 7) není přítomný α -kasein, který by se mohl potenciálně uvolňovat z nosiče. Ve frakcích příslušejícím protilátkám: frakce nepurifikovaných protilátek „21“ (dráha 2), frakce afinitně purifikovaných protilátek (dráha 6 a 7) a frakce protilátek nenavázaných na kolonu (dráha 1), jsou přítomny dvě zóny, které podle relativních molekulových hmotností odpovídají lehkým a těžkým řetězcům protilátky: lehký řetězec přibližně 21000 a těžký řetězec přibližně 70000 [54].

Ve frakci afinitně purifikované protilátky po eluci 0,05M diethylaminem (dráha 6 a 7) byly kromě zón příslušejících lehkým a těžkým řetězcům protilátky nalezeny i další zóny. Z obr. 4.10 (dráhy 6 a 7) je zřejmé, že zóna 2 (viz obr. 4.11) se v afinitně purifikované

protilátce po eluci 0,05M diethylaminem ve srovnání s původní nepurifikovanou protilátkou „21“ (dráha 2 obr. 4.10) zkoncentrovala.



Obr. 4.11: Výřez dráhy 6 z obr. 4.10 příslušející afinitně purifikované protilátce po eluci 0,05 M diethylaminem.

Zóny 1 až 4 byly z gelu vyříznuty, zpracovány a MALDI TOF MS/MS analýzou bylo určeno proteinové složení jednotlivých zón.

Pro identifikaci proteinových zón afinitně purifikované protilátky „E“ byly tyto zóny z gelu vyříznuty a proteiny proteolyticky štěpeny pomocí trypsinu (viz kapitola 3.4.3.1). Poté byly peptidy ze zón 1 až 4 (obr. 4.11) podrobeny MALDI-TOF MS/MS analýze. Výsledky MALDI-TOF MS/MS analýzy jsou shrnuty v tabulce 4.7.

Tabulka 4.7: Složky identifikované MALDI-TOF MS/MS analýzou v zónách afinitně purifikované protilátky IgY.

| zóna | m/z | sekvence identifikovaných peptidů | identifikované složky |
|-------------|------------|--|---|
| 1 | 2634,3 | NTGPTTPPLIYPFAPHPEELSLSR | Ig gamma řetězec, <i>Gallus gallus</i> |
| | 2033,9 | CLVVNLPSDSSSLSVTWTR | |
| 2 | 1495,8 | VSFLGHFIYSVAR | sérový albumin, <i>Gallus gallus</i> |
| | 1526,8 | RHPEFSIQLIMR | |
| | 1511,7 | AVAMITFAQYLQR | |
| | 1542,7 | RHPEFSIQLIMoxR | |
| 3 | 1761,08 | IGSHEIDMHPVNGQVK | Vitellogenin-2, <i>Gallus gallus</i> , sekvence 1638-1653 protein YPG40 |
| 4 | 2185,44 | VAPTITLFPPSKEELNEATK | Ig lambda řetězec C region, <i>Gallus gallus</i> |
| | 2938,77 | ATLVCLINDFYSPPTVDWVIDGSTR | |
| | 3246,93 | QSNSQYMASSYLSLSASDWSSHETTCR | |

Gallus gallus = kur domácí

MALDI-TOF MS/MS analýza potvrdila, že proteinová zóna 1 přísluší těžkému řetězci protilátky IgY a proteinová zóna 4 přísluší lehkému řetězci protilátky IgY. Zároveň bylo zjištěno, že peptidy získané ze zóny 2 odpovídají slepičímu sérovému albuminu a z peptidů získaných z minoritní zóny 3 byl identifikován protein Vitellogenin-2.

5. DISKUZE

Efektivní izolace a purifikace proteinů z biologických vzorků představuje velmi důležitý krok jejich úspěšné analýzy. V posledních letech bylo objeveno mnoho typů magnetických částic o mikrometrovém nebo nanometrovém průměru, které se v různých modifikacích používají k separaci proteinů z komplexních biologických směsí. Ve spojení s hmotnostní analýzou představuje magnetická separace velmi citlivou a rychlou metodu pro identifikaci proteinů a peptidů z biologických vzorků, především díky jednoduché manipulaci s použitím externího magnetu a vysoké vazebné kapacity a malým rozměrům magnetických částic [45].

Magnetické částice mohou být modifikovány různými funkčními skupinami a biologicky aktivními látkami. Funkční skupiny (např. hydroxylové, karboxylové, thiolové nebo aminové) navázané na povrchu magnetických částic se uplatňují jednak při separacích a jednak jsou použitelné pro navázání vhodných ligandů. Imobilizace enzymů, protilátek, oligonukleotidů a jiných biologicky aktivních látek na magnetické částice nalézají uplatnění v mnoha oborech [55].

Úkolem této části diplomové práce bylo aplikovat neporézní hydrofilní poly(2-hydroxyethyl metakrylát-*co*-glycidyl metakrylátové) magnetické částice P(HEMA-*co*-GMA) modifikované iminodioctovou kyselinou, připravené na Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd České republiky Dr. D. Horákem, k separaci fosfopeptidů z proteolytických směsí modelových fosfoproteinů. Tyto magnetické částice se připravují disperzní kopolymerací 2-hydroxyethylmetakrylátu (HEMA) s glycidyl metakrylátem (GMA) v přítomnosti koloidních oxidů železa a již byli použity např. při izolaci bakteriální DNA [56], k magnetické separaci buněk *Salmonella* pomocí protilátek proti buňkám *Salmonella* imobilizovaných na magnetických částicích [57], ke studiu struktury různorodých glykoproteinů [58], k identifikaci a charakterizaci probiotických bakterií z mléčných výrobků [59] a funkcionalizované magnetické částice (s imobilizovanými enzymy RNázou A, DNázou A, proteinkinázou A a protilátkami proti buňkám *Salmonella*) byly použity v molekulární diagnostice [60]. Jako sorbent při afinitní chromatografii na imobilizovaných kovových iontech byli magnetické částice P(HEMA-*co*-GMA) modifikované iminodioctovou kyselinou s imobilizovanými Fe(III) ionty použity k separaci prasečího pepsinu A a s imobilizovanými Ni(II) ionty k adsorpci lidských

imunoglobulinů [47]. Další studie však ukázaly, že pro detailnější studium fosforylovaných proteinů je výhodnější, zvláště v kombinaci s hmotnostní analýzou, separace fosfopeptidů po proteolytickém štěpení fosfoproteinů.

V diplomové práci byly magnetické částice P(HEMA-*co*-GMA) modifikované iminodioctovou kyselinou poprvé použity jako sorbent pro separaci fosfopeptidů z komplexních směsí afinitní chromatografií na imobilizovaných kovových iontech. Selektivita adsorpce fosfopeptidů na magnetický sorbent při afinitní chromatografii na imobilizovaných kovových iontech závisí na několika faktorech:

- imobilizovaném kovovém iontu
- chelatačním činidle
- vlastnostech gelu nebo polymeru, který pokrývá magnetické jádro
- adsorpčních podmínkách
- elučních podmínkách

Připravený magnetický sorbent obsahoval navázanou iminodioctovou kyselinu (IDA), která sloužila jako chelát pro trojmocné ionty kovů Ga(III) a Fe(III). Iminodioctová kyselina spolu s nitrilotrioctovou kyselinou patří mezi nejpoužívanější chelatační ligandy při afinitní chromatografii na imobilizovaných kovových iontech [5, 6, 8].

Na připravené magnetické částice P(HEMA-*co*-GMA) modifikované iminodioctovou kyselinou byly imobilizovány Fe(III) nebo Ga(III) ionty. Fosfopeptidy byly ze vzorku separovány díky specifické interakci mezi Fe(III) nebo Ga(III) ionty imobilizovanými na částicích a fosfátovou skupinou fosfopeptidů. Při afinitní chromatografii na imobilizovaných iontech kovů patří Fe(III) ionty k nejpoužívanějším pro svou dobrou selektivitu při separacích fosfopeptidů [8, 26]. Kromě Fe(III) iontů se k separacím fosfopeptidů používají i další kovové ionty jako Ga(III), Al(III) a Zr(IV) [28, 29].

Hlavním limitujícím faktorem metody IMAC je adsorpce nefosforylovaných peptidů bohatých na aminokyseliny s volnými karboxylovými skupinami, což výrazně snižuje selektivitu separačního postupu [26, 28, 32, 35]. Adsorpci takovýchto nefosforylovaných peptidů lze ovlivnit vhodnou volbou pH adsorpčního pufru [28, 33, 36, 37, 38]. Některé studie prokázaly, že interakce mezi kovovým iontem a karboxylovou skupinou postranního řetězce aminokyseliny lze minimalizovat zvýšením iontové síly při adsorpci [33], nicméně v jiných studiích nebyl tento vliv pozorován [39]. Další možností, jak zabránit této nežádoucí vazbě, je esterifikace karboxylových skupin [35], která je ovšem spojena se

zavedením dalších reakčních kroků a tím i se ztrátou vzorku a zvýšením časové náročnosti metody. V naší práci jsme hledali vhodné pH a iontovou sílu adsorpčního pufru, abychom dosáhli co nejvyšší selektivity separačního postupu na připraveném magnetickém sorbentu.

Byly hledány adsorpční podmínky, za kterých se na připravený magnetický sorbent adsorbuje co nejvíce fosforylovaných peptidů přítomných ve vzorku a zároveň co nejméně nefosforylovaných peptidů (testované podmínky viz kapitola 3.3.3.3). Nejprve bylo hledáno nejvhodnější pH adsorpčního pufru. Na základě vztahu mezi hodnotou pH a znalostí hodnot pK_a kyseliny asparagové (3,65), kyseliny glutamové (4,25) a fosfátové skupiny (1,52) lze optimální pH očekávat mezi 2,5 až 3,0. Při tomto pH jsou téměř všechny fosfátové skupiny negativně nabitě a pouze malá část karboxylových skupin kyselých aminokyselin je negativně nabitá [36]. Stanovené optimální hodnoty pH odpovídají těmto předpokladům. Při separaci fosfopeptidů z proteolytických směsí obou modelových proteinů bylo optimální pH nalezeno v rozmezí hodnot 2,5 až 2,7 (6% kyselina octová nebo 3% kyselina octová). pH v rozmezí 2,0 až 3,5 je při IMAC separaci fosfopeptidů běžně používáno [28]. Takto nízké pH obvykle nelze použít při IMAC separaci fosfoproteinů, protože některé proteiny mohou při tak nízkém pH precipitovat [33]. Zvyšování pH adsorpčního pufru mělo na selektivitu adsorpce fosfopeptidů negativní vliv. Testovaná adsorpce v acetátovém pufru o pH 3,5 až 6,0 ukázala nárůst počtu detekovaných nefosforylovaných peptidů i detekci menšího počtu fosforylovaných peptidů.

Dále byla testována změna iontové síly adsorpčního pufru. Zvýšení iontové síly adsorpčního pufru vede k zeslabení elektrostatických interakcí mezi peptidy a nabitými IMAC sorbenty. V důsledku zvýšení iontové síly adsorpčního pufru dojde ke snížení adsorpce těch peptidů, které interagují s IMAC sorbenty prostřednictvím elektrostatických interakcí. Zvýšením iontové síly adsorpčního pufru se podařilo dosáhnout snížení počtu adsorbovaných nefosforylovaných peptidů. Některé nefosforylované peptidy se tedy na IMAC sorbent váží pravděpodobně prostřednictvím elektrostatických interakcí. Testovaný 0,1 M NaCl v adsorpčním pufru nevedl ke snížení sorpce nefosforylovaných peptidů ve srovnání s čistým adsorpčním pufrem, zatímco po přidání 1M NaCl do adsorpčního pufru jsme kromě snížení počtu adsorbovaných nefosforylovaných peptidů pozorovali i menší počet adsorbovaných fosfopeptidů. Po přidání 0,5 M NaCl do adsorpčního pufru jsme obecně pozorovali menší množství nefosforylovaných peptidů adsorbovaných na magnetický sorbent než v adsorpčním pufru, který NaCl neobsahoval, při zachování

stejného počtu adsorbovaných fosfopeptidů. K podobnému závěru dospěli Machida a kol. [33], množství proteinů navázaných na IMAC sorbent se se zvyšující iontovou silou adsorpčního pufru snižovalo, čímž bylo dosaženo vyšší selektivity při vazbě fosforylovaných proteinů na IMAC sorbent. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití 0,5 M NaCl v adsorpčním pufru.

Další nežádoucí sorpce nefosforylovaných peptidů jsme se pokusily snížit přidavkem acetonitrilu do adsorpčního pufru, který již obsahoval 0,5 M NaCl. Přítomnost acetonitrilu v adsorpčním pufru má potlačit případné hydrofobní interakce s IMAC sorbenty [37]. Vliv acetonitrilu na selektivitu adsorpce fosfopeptidů není jednoznačný. V případě proteolytické směsi prasečího pepsinu A bylo pozorováno další snížení počtu adsorbovaných nefosforylovaných peptidů oproti adsorpčnímu pufru obsahujícímu pouze NaCl. V případě proteolytické směsi α -kaseinu se za některých adsorpčních podmínek podařilo přidavkem acetonitrilu do adsorpčního pufru dosáhnout snížení počtu adsorbovaných nefosforylovaných peptidů, zatímco v některých podmínkách došlo po přidání acetonitrilu ke snížení počtu adsorbovaných fosfopeptidů. Je tedy možné, že přítomnost acetonitrilu v adsorpčním pufru napomáhá snížení počtu adsorbovaných nefosforylovaných peptidů u proteolytických směsí kyselých proteinů (prasečí pepsin A). Kokubu a kol. [37] pozorovali zvýšení selektivity IMAC separace fosfopeptidů z tryptické směsi ovalbuminu v přítomnosti 40-60% acetonitrilu v adsorpčním pufru.

Za konstantních adsorpčních podmínek (acetátový pufr pH 4,0) jsme změnou elučních pufrů hledali nejvhodnější eluční podmínky. V případě fosfopeptidů lze eluci provádět zvýšením pH nebo přidavkem fosfátu [28]. Bylo testováno několik elučních činidel: 5 mM hydroxid amonný, hydrogenfosforečnan amonný (0,2; 0,5 a 1M) a kyselina fosforečná (0,1%; 1,0% a 10 %) obsahující acetonitril 0 nebo 50%. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití 0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ nebo 1% kyseliny fosforečné obsahující 0% nebo 50% acetonitril. V elučních frakcích byly detekovány jak fosfopeptidy s jednou fosfátovou skupinou tak i vícenásobně fosforylované peptidy. 0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ byl vybrán a používán jako jediné eluční činidlo při všech IMAC experimentech v této práci. Ostatní eluční činidla (0,1% a 10% kyselina fosforečná; 0,5 M a 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ a 5 mM NH_4OH) uvolňovala menší počet fosforylovaných peptidů adsorbovaných na připravený magnetický sorbent, obvykle byly v eluátu pozorovány pouze fosfopeptidy s jednou fosfátovou skupinou.

Výsledky naší práce ukazují, že připravený magnetický sorbent představuje vhodný nástroj pro separaci fosfopeptidů z komplexních směsí. Zvláště výhodné se zdá být použití při separacích fosfopeptidů z proteolytických směsí kyselých proteinů (zástupce prasečí pepsinu A). V MALDI-TOF MS spektru neseparované směsi peptidů získané štěpením prasečího pepsinu A α -chymotrypsinem nebyl nalezen žádný fosfopeptid. Za optimálních adsorpčních a elučních podmínek byly v MALDI-TOF MS spektru, po předchozí IMAC separaci na připravených magnetických sorbentech, nalezeny dva fosforylované peptidy a žádný nefosforylovaný peptid. Stejných výsledků bylo dosaženo při použití Fe(III)-IDA i Ga(III)-IDA modifikovaného magnetického sorbentu. V MALDI-TOF MS spektrech byl identifikován dominantní fosfopeptid o m/z 1321 a druhý fosforylovaný peptid o m/z 1343, který je adukt původního fosfopeptidu (m/z 1321) se sodíkem.

V případě proteolytické směsi vzniklé štěpením prasečího pepsinu A α -chymotrypsinem lze IMAC separaci fosfopeptidů na připravených Fe(III)-IDA a Ga(III)-IDA modifikovaných magnetických sorbentech považovat za zcela úspěšnou. Z proteolytické směsi prasečího pepsinu A se za nalezených optimálních adsorpčních a elučních podmínek podařilo separovat jediný fosfopeptid přítomný ve vzorku a nebyly detekovány žádné nefosforylované peptidy.

Na připravených Fe(III)-IDA a Ga(III)-IDA modifikovaných magnetických sorbentech byly úspěšně separovány i fosfopeptidy z proteolytické směsi získané štěpením α -kaseinu trypsinem. V MALDI-TOF MS spektru směsi peptidů získané štěpením α -kaseinu trypsinem byl nalezen jediný fosfopeptid a 14 nefosforylovaných peptidů. Poté, co byla proteolytická směs α -kaseinu nejprve podrobena IMAC separaci na magnetickém sorbentu, bylo v MALDI-TOF MS spektru identifikováno 10 fosfopeptidů a 2 nefosforylované peptidy v případě Fe(III)-IDA modifikovaného magnetického sorbentu a 12 fosfopeptidů a 4 nefosforylované peptidy při užití Ga(III)-IDA modifikovaného magnetického sorbentu. Kromě fosfopeptidů s jednou fosfátovou skupinou byly identifikovány i vícenásobně fosforylované peptidy: byl identifikován jeden pětínásobně fosforylovaný peptid, jeden čtyřnásobně fosforylovaný peptid, dva trojnásobně fosforylované peptidy a tři dvojnásobně fosforylované peptidy. Fosfopeptidů s jednou fosfátovou skupinou bylo identifikováno šest.

Separace fosfopeptidů z proteolytické směsi získané rozštěpením α -kaseinu trypsinem na připravených Fe(III)-IDA a Ga(III)-IDA modifikovaných magnetických sorbentech umožnila detekci nejen fosfopeptidů s jednou fosfátovou skupinou, ale i vícenásobně

fosforylovaných peptidů. Volbou vhodných adsorpčních a elučních podmínek se podařilo minimalizovat adsorpci nefosforylovaných peptidů.

Byla porovnána schopnost imobilizovaných Fe(III) a Ga(III) iontů selektivně separovat fosfopeptidy z proteolytických směsí modelových proteinů. Některé studie uvádějí, že imobilizované Fe(III) ionty jsou schopny adsorbovat více fosforylovaných peptidů než imobilizovaní Ga(III) ionty [32]. Naopak jiné studie zjistily vyšší afinitu imobilizovaných Ga(III) iontů k fosfopeptidům [28] a ukázaly, že na imobilizované Ga(III) ionty se adsorbuje více fosfopeptidů než na imobilizované Fe(III) ionty [33]. Sykora a kol. [46] na imobilizovaných Ga(III) iontech pozorovali vyšší adsorpci fosfopeptidů s jednou fosfátovou skupinou, zatímco na imobilizovaných Fe(III) iontech se více adsorbovaly vícenásobně fosforylované peptidy. V naší práci byla zjištěna stejná selektivita imobilizovaných Fe(III) a Ga(III) iontů při separaci fosfopeptidů z proteolytické směsi prasečího pepsinu A: ze vzorku byl na imobilizovaných Fe(III) i Ga(III) iontech separován jediný fosfopeptid (m/z 1321) a žádné nefosforylované peptidy. Z proteolytické směsi z α -kaseinu bylo v MALDI-TOF MS spektru nalezeno 10 fosfopeptidů a 2 nefosforylované peptidy na imobilizovaných Fe(III) iontech a 12 fosfopeptidů a 4 nefosforylované peptidy na imobilizovaných Ga(III) iontech. Vyšší selektivita byla tedy pozorována u imobilizovaných Fe(III) iontů (detekce menšího počtu nefosforylovaných peptidů), zatímco na imobilizovaných Ga(III) iontech se podařilo identifikovat o dva fosfopeptidy více než na imobilizovaných Fe(III) iontech. Vyšší selektivita imobilizovaných Fe(III) iontů k vícenásobně fosforylovaným peptidům nebyla pozorována.

Z uvedených výsledků je zřejmé, že hydrofilní poly(2-hydroxyethyl metakrylát-*co*-glycidyl metakrylátové) magnetické částice P(HEMA-*co*-GMA) modifikované iminodioctovou kyselinou s imobilizovanými Fe(III) nebo Ga(III) jsou vhodnými sorbenty při separacích fosfopeptidů z komplexních směsí. Po optimalizaci adsorpčních a elučních podmínek lze na připraveném magnetickém sorbentu s úspěchem selektivně separovat fosfopeptidy z proteolytických směsí obsahujících velké množství kyselých peptidů, zároveň je připravený magnetický sorbent vhodný k separaci fosfopeptidů s jednou fosfátovou skupinou i vícenásobně fosforylovaných peptidů. Separace fosfopeptidů je nezbytná pro jejich detekci hmotnostní spektrometrií. Přítomnost velkého počtu nefosforylovaných peptidů může vést k potlačení ionizace fosforylovaných peptidů. V

důsledku toho jsou signály fosfopeptidů v MALDI-TOF MS spektrech původních vzorků (bez předchozí izolace fosfopeptidů) výrazně redukovány nebo nejsou přítomny.

Imunochemické metody představují další přístup pro separaci fosfoproteinů ze směsí nefosforylovaných proteinů. Důležitou vlastností při použití imunochemických metod je selektivita a afinita použitých protilátek, jinak může být detekováno velké množství „falešně pozitivních odpovědí“, které výrazně snižují použitelnost této metody [1]. V mnoha pracích již byly úspěšně použity protilátky specifické pro fosfotyrosin k separaci proteinů fosforylovaných na tyrosinových zbytcích [10, 15, 16, 17]. Zatímco protilátky specifické pro fosfotyrosin jsou běžně dostupné a používány při imunoprecipitacích fosfoproteinů, spolehlivé protilátky specifické pro fosfoserin a fosfothreonin stále nejsou běžně dostupné [1]. Protilátky specifické pro fosfoserin a fosfothreonin totiž velmi často rozpoznávají celý sekvenční motiv obklopující fosforylovaný aminokyselinový zbytek, proto jsou schopné imunoprecipitovat pouze některé fosfoproteiny [6]. Protilátky specifické pro fosfotyrosin byly v nedávné době imobilizovány na magnetické částice přes protein G a úspěšně použity k separaci fosfopeptidů z proteolytické směsi nefosforylovaných peptidů [61].

Cílem druhé části diplomové práce bylo použít slepičí protilátky IgY specifické pro fosfoserin, po imobilizaci na neporézní hydrofilní poly(2-hydroxyethyl metakrylát-*co*-glycidyl metakrylátové) magnetické částice P(HEMA-*co*-GMA) modifikované iminodioxovou kyselinou, k separaci proteinů fosforylovaných na serinových zbytcích.

Neporézní hydrofilní poly(2-hydroxyethyl metakrylát-*co*-glycidyl metakrylátové) magnetické částice P(HEMA-*co*-GMA) modifikované iminodioxovou kyselinou s imobilizovanými Ni(II) ionty byly použity k adsorpci lidských imunoglobulinů IgG [47] a k magnetické separaci buněk *Salmonella* pomocí protilátek proti buňkám *Salmonella* imobilizovaných na magnetických částicích [57]. Bylo by zajímavé připravený magnetický sorbent použitý při IMAC separaci fosfopeptidů s proteolytických směsí modelových fosfoproteinů, použít k adsorpci slepičích protilátek specifických pro fosfoserin a imobilizované protilátky využít k analýze fosfoproteinů. Z důvodů zjištěné nízké specifity připravených protilátek nebyly protilátky IgY použity k imobilizaci na připravený magnetický sorbent a dalším experimentům.

Imunoglobulin IgY je hlavním imunoglobulinem ptáků, svojí funkcí v organismu si nejvíce odpovídá se savčím imunoglobulinem IgG. Výhodou slepičích protilátek oproti

protilátkám savců je, že příprava protilátek je prováděna neinvazivní technikou a to shromážděním vajec imunizovaných zvířat. Vaječné žloutky jsou každodenním vydatným zdrojem protilátek IgY (asi 10 mg IgY/ na žloutek) [62].

Protilátky IgY byly izolovány afinitní chromatografií na sloupci Sepharosy s imobilizovaným α -kaseinem. Jako ligand pro afinitní chromatografii byl zvolen α -kasein, protože obsahuje velké množství fosfoserinových zbytků, které jsme v předchozí část práce identifikovali MALDI-TOF MS/MS analýzou.

ELISA testy ukazují na nízkou specifitu připravených protilátek. Důvodů nízké specifity připravených protilátek mohlo být několik. ELISA testy byla testována specifita původní nepurifikované protilátky „21“ a afinitně purifikované protilátky „E“.

Z výsledků ELISY je patrné, že afinitně purifikovaná protilátka „E“ má silnější odpověď na α -kaseinu, ovalbuminu z vaječného bílku a na BSA (I) i BSA (II) než nepurifikovaná protilátka „21“. Pozitivní odpověď na fosforylovaných proteinech: α -kaseinu a ovalbuminu z vaječného bílku byla očekávána u purifikované i nepurifikované protilátky, protože oba uvedené proteiny jsou fosforylované na serinových zbytcích. Silnější odpověď afinitně purifikované protilátky „E“ ve srovnání s nepurifikovanou protilátkou „21“ byla také očekávána. Pozitivní odpověď na BSA nebyla očekávána ani u nepurifikované protilátky „21“ ani u afinitně purifikované protilátky „E“. Tato skutečnost by mohlo být vysvětlena tím, že BSA je také protein obsahující fosfáty na serinových zbytcích, i přesto že BSA bylo použito jako kontrolní antigen neobsahující fosfátové skupiny. V nedávné době se v databázi UniProtKB objevila informace o možné fosforylaci molekuly BSA o to hned na třech serinových zbytcích (obr. 5.1).

| Amino acid modifications | | | | | |
|--------------------------|------------------|-----|---|------------------|---------------|
| <input type="checkbox"/> | Modified residue | 82 | 1 | Phosphoserine | By similarity |
| <input type="checkbox"/> | Modified residue | 108 | 1 | Phosphotyrosine | By similarity |
| <input type="checkbox"/> | Modified residue | 163 | 1 | Phosphotyrosine | By similarity |
| <input type="checkbox"/> | Modified residue | 296 | 1 | Phosphoserine | By similarity |
| <input type="checkbox"/> | Modified residue | 442 | 1 | Phosphoserine | By similarity |
| <input type="checkbox"/> | Modified residue | 443 | 1 | Phosphothreonine | By similarity |
| <input type="checkbox"/> | Modified residue | 445 | 1 | Phosphothreonine | By similarity |

Obr. 5.1: Možná fosforylační místa molekuly BSA. Zdroj: UniProtKB 20.04.2010

Na syntetických antigenech: maleylovaném BSA s navázaným O-fosforyl-L-serinem (p-Ser-MA-BSA) a maleylovaném BSA (MA-BSA) má afinitně purifikovaná protilátka „E“ slabší odpovědi než nepurifikovaná protilátka „21“. Pozitivní odpověď nepurifikované protilátky „21“ i afinitně purifikované protilátky „E“ na p-Ser-MA-BSA byla očekávána. Byla ale očekávána silnější odpověď afinitně purifikované protilátky „E“ ve srovnání s nepurifikovanou protilátkou „21“. Intenzita odpovědí obou protilátek byla opačná. Slepice byly imunizovány KLH s navázaným O-fosforyl-L-serinem, který byl na maleylovaný derivát KLH navázán karbodiimidovou reakcí. Připravené syntetické antigeny (p-Ser-MA-BSA a MA-BSA) byly také připraveny karbodiimidovou reakcí a ve své molekule obsahují maleylový zbytek. Je možné, že slepice kromě protilátek proti fosfoserinu produkovaly i protilátky proti maleylovému zbytku. Tím by bylo možné vysvětlit pozitivní odpovědi na MA-BSA i fakt, že afinitně purifikovaná protilátka „E“ má na syntetických antigenech slabší odpověď než nepurifikovaná protilátka „21“, protože afinitní purifikací byla reakce na maleyl eliminována. Jak je uvedeno výše, za předpokladu že je BSA také fosforylovaný, lze vysvětlit i pozitivní odpověď afinitně purifikované protilátky „E“ na MA-BSA. Dalším možným vysvětlením je velmi nízká specifita připravených protilátek. Za předpokladu, že BSA není fosforylovaný, tak s ním připravené protilátky IgY reagují nespecificky. Kontrolní protilátky „K“ reagovaly velmi slabě nebo vůbec na všech antigenech.

SDS-PAGE elektroforéza purifikované frakce protilátek IgY a následná MALDI-TOF MS/MS analýza peptidů detekovaných v proteinových zónách po SDS-PAGE byla použita k identifikaci protilátek: bylo prokázáno že, frakce IgY získaná afinitní chromatografií na imobilizovaném α -kaseinu obsahuje protilátky IgY (identifikace lehkého a těžkého řetězce) a kuřecí sérový albumin. Kuřecí sérový albumin se pravděpodobně „kopurifikoval“ na Sepharose s imobilizovaným α -kaseinem. Sogorb a kol. [63] pozorovali schopnost kuřecího sérového albuminu hydrolyzovat fosfoesterové vazby, není tedy vyloučeno, že se kuřecí sérový albumin může vázat na serinové zbytky α -kaseinu. Další možností je, že se kuřecí sérový albumin nějakým způsobem váže na protilátky IgY již před afinitní purifikací a purifikoval se navázaný na protilátky. Přítomnost kuřecího sérového albuminu v purifikované frakci protilátek výrazně snižuje kvalitu získané frakce, protože afinitně purifikované protilátky jsou kuřecím sérovým albuminem naředěné.

Získané výsledky představují první krok v řešení přístupu separace fosfoproteinů pomocí slepičích protilátek specifických pro fosfoserin.

Další práce bude třeba zaměřit na hledání podmínek separace protilátek IgY a dále také na metody přípravy syntetických antigenů jak pro imunizaci zvířat, tak pro přípravu modelových fosfoproteinů pro ELISA testy, s definovaným obsahem fosfoserinových zbytků.

Metodu separace fosfoproteinů pomocí slepičích protilátek specifických pro fosfoserin na připravených magnetických sorbentech se nepodařilo vypracovat. Důvodem byla zjištěná nízká specifita připravených protilátek. K vyřešení tohoto problému je třeba provést další experimenty.

6. ZÁVĚR

Byla vypracována metoda pro studium fosforylačních míst fosfoproteinů založená na separaci fosfopeptidů z proteolytických směsí modelových fosfoproteinů na nových IMAC magnetických sorbentech a následné hmotnostní analýze.

Magnetické částice P(HEMA-*co*-GMA) modifikované iminodiotovou kyselinou a obsahující imobilizované Fe(III) nebo Ga(III) ionty byly použity k separacím fosfopeptidů z proteolytických směsí peptidů modelových fosfoproteinů: α -kaseinu a prasečího pepsinu A. Naše výsledky ukazují, že jsou tyto magnetické částice vhodnými sorbenty při separacích fosfopeptidů z proteolytických směsí. Nebyly pozorovány žádné zásadní odlišnosti při separacích na imobilizovaných Fe(III) a Ga(III) iontech.

Optimalizací adsorpčních a elučních podmínek se nám na připravených magnetických sorbentech podařilo selektivně separovat fosfopeptidy z proteolyticky rozštěpeného modelového fosfoproteinu, který obsahoval velké množství kyselých peptidů (prasečí pepsin A). Zároveň jsme ukázali, že připravené magnetické sorbenty jsou vhodné k separaci fosfopeptidů s jednou fosfátovou skupinou i vícenásobně fosforylovaných peptidů.

Fosfopeptidy separované z proteolytických směsí peptidů modelových fosfoproteinů byly analyzovány MALDI-TOF MS analýzou a jejich fosforylační místa byla ověřena MALDI-TOF MS/MS analýzou.

Pro imunochemickou metodu separace fosfoproteinů byla připravena frakce protilátek z vaječných žloutků získaných od slepic imunizovaných pomocí proteinu KLH (keyhole limpet hemocyanin) s navázaným O-fosforyl-L-serinem (firma Hena s.r.o.).

Pomocí afinitní chromatografie na imobilizovaném α -kaseinu byla izolována frakce protilátek, jejichž přítomnost byla dokázána pomocí MALDI TOF MS/MS analýzy.

Specifita protilátek izolovaných na imobilizovaném α -kaseinu byla testována pomocí ELISA testů. Tato frakce slepičích protilátek však vykazovala nízkou specifitu proti O-fosforyl-L-serin obsahujícím proteinům.

Vzhledem k zjištěné nízké specifitě nebyly připravené slepičí protilátky imobilizovány na magnetické částice P(HEMA-*co*-GMA) a používány pro další experimenty.

SEZNAM LITERATURY

- [1] Raggiaschi R., Gotta S., Terstappen G. C.: Biosci. Rep. 25, 33-44 (2005)
- [2] Marks F.: Protein phosphorylation. VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo (1996)
- [3] Fischer E. H., Krebs E. G.: J. Biol. Chem. 216, 121-132 (1955)
- [4] Sutherland E. W., Wosilait W. Y.: Nature 175, 169-170 (1955)
- [5] Halada P.: Chem. Listy 99, 922-929 (2005)
- [6] Schmidt S. R., Schweikart F., Andersoon M. E.: J. Chromatogr. B 849, 154-162 (2007)
- [7] Han G., Ye M., Zou H.: Analyst 133, 1128-1138 (2008)
- [8] Dunn J. D., Reid G. E., Bruening M. L.: Mass Spectrom. Rev. 29, 29-54 (2009)
- [9] Zhou H., Ye M., Dong J., Han G., Jiang X., Wu R., Zou H.: J. Proteome Res. 7, 3957-3967 (2008)
- [10] Ross A. H., Baltimore D., Eisen H. N.: Nature 294, 654-656 (1981)
- [11] Grønborg M., Kristiansen T. Z., Stensballe A., Andersen J. S., Ohara O., Mann M., Jensen O. N., Pandey.: Mol. Cell. Proteomics 1, 517-527 (2002)
- [12] Marcus K., Immler D., Sternberger J., Meyer H. E.: Electrophoresis 21, 2622-2636 (2000)
- [13] Gatti A.: Anal. Biochem. 321, 252-255 (2003)
- [14] Zhang G., Neubert T. A.: Proteomics 6, 571-578 (2006)
- [15] Pandey A., Podtelejnikov A. V., Blagoev B., Bustelo X. R., Mann M., Lodish H. F.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 97, 179-184 (2000)
- [16] Di Fiore P.P., Fazioli F.: Methods Mol. Biol. 124, 221-237 (2001)
- [17] Steen H., Kuster B., Fernandez M., Pandey A., Mann M.: J. Biol. Chem. 277, 1031-1039 (2002)
- [18] Oda Y., Nagasu T., Chait B. T.: Nat. Biotechnol. 19, 379-382 (2001)
- [19] Zhou H., Watts J. D., Aebersold R.: Nat. Biotechnol. 19, 375-378 (2001)
- [20] Matsuda H., Nakamura H., Nakajima T.: Anal. Sci. 6, 911-912 (1990)
- [21] Pinkse M. W., Uitto P. M., Hilhorst M. J., Ooms B., Heck A. J.: Anal. Chem. 76, 3935-3943 (2004)
- [22] Larsen M. R., Thingholm T. E., Jensen O. N., Roepstorff P., Jorgensen T. J.: Mol. Cell. Proteomics 4, 873-886 (2005)

- [23] Kweon H. K., Hakansson K.: *Anal. Chem.* 78, 1743-1749 (2006)
- [24] Li Y., Liu Y., Tang J., Lin H., Yao N., Shen X., Deng Ch., Yang P., Zhang X.: *J. Chrom. A* 1172, 57-71 (2007)
- [25] Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G.: *Nature* 258, 598-599 (1975)
- [26] Neville D. C. A., Rozanas Ch. R., Price E. M., Gruis D. B., Verkman A. S., Townsend R. R.: *Protein Sci.* 6, 2436-2445 (1997)
- [27] Li S. H., Dass C.: *Anal. Biochem.* 270, 9-14 (1999)
- [28] Posewitz M. C., Tempst P.: *Anal. Chem.* 71, 2883-2892 (1999)
- [29] Nühse T. S.; Stensballe A., Jensen O. N., Peck S. C.: *Mol. Cell. Proteomics* 2, 1234-1243 (2003)
- [30] Baldwin C., Cumming J., Timperman A.: *Analyst* 130, 318-324 (2005)
- [31] Kinoshita E., Yamada A., Takeda H., Kinoshita-Kikuta E., Koike T.: *J. Sep. Sci.* 28, 155-162 (2005)
- [32] Brill L. M., Salomon A. R., Ficarro S. B., Mukherji M., Stettler-Gill M., Peters E. C.: *Anal. Chem.* 76, 2763-2772 (2004)
- [33] Machida M., Kosako H., Shirakabe K., Kobayashi M., Ushiyama M., Inagawa J., Hirano J., Nakano T., Bando Y., Nishida E., Hattori S.: *FEBS J.* 274, 1576-1587 (2007)
- [34] Sykora C., Hoffmann R., Hoffmann P.: *Protein Pept. Lett.* 14, 489-496 (2007)
- [35] Ficarro S. B., McClelland M. L., Stukenberg P. T., Ross M. M., Shabanowitz J., Hunt D. F., White F. M.: *Nat. Biotechnol.* 20, 301-305 (2002)
- [36] Tsai Ch. F., Wang Y. T., Chen Y. R., Lai Ch. Y., Lin P. Y., Pan K. T., Chen J. Y., Khoo K. H., Chen Y. J.: *J. Proteome Res.* 7, 4058-4069 (2008)
- [37] Kokubu M., Ishihama Y., Sato T., Nagasu T., Oda Y.: *Anal. Chem.* 77, 5144-5154 (2005)
- [38] Lin F. Y., Chen W. Y., Huang S. Y.: *Bioprocess Engineering* 23, 467-471 (2000)
- [39] Ndassa Y. M., Orsi C., Marto J. A., Chen S., Ross M. M.: *J. Proteome Res.* 5, 2789-2799 (2006)
- [40] Seeley E. H., Riggs L. D., Regnier F. E.: *J. Chromatogr. B* 817, 81-88 (2005)
- [41] Feuerstein I., Morandell S., Stecher G., Huck Ch. W., Stasyk T., Huang H. L., Teis D., Huber L. A., Bonn G. K.: *Proteomic* 5, 46-54 (2005)
- [42] Franzreb M., Siemann-Herzberg M., Hobley T., Thomas O.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70, 505-516 (2006)
- [43] Safarik I., Safarikova M.: *Biomagn. Res. Technol.* 2, 7-24 (2004)

- [44] Novotna L., Hruby M., Benes M., Kucerova Z.: J. Sep. Sci. 31, 1662-1668 (2008)
- [45] Peter J. F., Otto A. M.: Proteomics 10, 628-633 (2010)
- [46] Sykora C., Hoffmann R., Hoffmann P.: Protein Pept. Lett. 14, 489-496 (2007)
- [47] Přikryl P., Horák D., Tichá M., Kučerová Z.: J. Sep. Sci. 29, 2541-249 (2006)
- [48] Dong M., Wu M., Wang F., Qin H., Han G., Dong J., Wu R., Ye M., Liu Z., Zou H.: Anal. Chem. 82, 2907-2915 (2010)
- [49] Imanishi S. Y., Kochin V., Ferraris S. E., de Thonel A., Pallari H. M., Corthals G. L., Eriksson J. E.: Mol. Cell. Proteomics 6, 1380-1391 (2007)
- [50] Mercier J., Grosclaude F., Ribadeau-Dumas B.: Eur. J. Biochem. 23, 41-51 (1971)
- [51] Tang J., Hartley B.: Biochem. J. 118, 611-623 (1970)
- [52] Sustrova B., Novotna L., Kucerova Z., Ticha M.: J. Mol. Catal. B Enzym. 60, 22-28 (2009)
- [53] Morávek L., Kostka V.: FEBS Lett. 43, 207-211 (1974)
- [54] Hatta H., Tsuda K., Akachi S., Kim M., Yamamoto T.: Biosci. Biotechnol. Biochem. 57, 450-454 (1993)
- [55] Safarik I., Safarikova M.: Chem. Papers 63, 497-505 (2009)
- [56] Rittich B., Španová A., Horák D., Beneš M.J., Klesnilová L., Petrová K., Rybníkář A.: Colloids Surf. B: Biointerfaces 52, 143-148 (2006)
- [57] Španová A., Rittich B., Horák D., Lenfeld J., Prodělalová J., Suciková J., Strumcová S.: J. Chromatogr. A. 15, 215-221 (2003)
- [58] Korecká L., Ježová J., Bílková Z., Beneš M., Horák D., Hradcová O., Slováková M., Viovy J. L.: J. Magn. Mater. 293, 349-357 (2005)
- [59] Rittich B., Španová A., Šálek P., Němcová P., Trachtová Š., Horák D.: J. Magn. Mater. 321, 1667-1670 (2009)
- [60] Rittich B., Španová A., Horák D.: Food Res. Int. 42, 493-498 (2009)
- [61] Condina M. R., Guthridge M. A., McColl S. R., Hoffmann P.: Proteomics 9, 3047-3057 (2009)
- [62] Hodek P., Stiborová M.: Proc. Indian. Natn. Sci. Acad. B69, 461-468 (2003)
- [63] Sogorb M. A., Monroy A., Vilanova E.: Chem. Res. Toxicol. 11, 1441-1446 (1998)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

| Jméno a příjmení | Číslo OP | Datum vypůjčení | Poznámka |
|-------------------------|-----------------|------------------------|-----------------|
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

